



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DR. Jean Michel Grévy Macquart
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *Caracterización funcional de los genes ROPs en el rearrreglo del citoesqueleto en respuesta a la endosimbiosis bacteriana en Lotus japonicus*, que presenta la alumna **Yareni Marlene Cruz Farfán (10019225)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	Aprobada	
Dra. Verónica Lira Ruan CIDC-UAEM	Aprobada	
Dra. Elizabeth Córdoba Martínez IBT-UNAM	Aprobada	
Dr. Nelson Avonce Vergara CIDC-UAEM	Aprobada	
Dr. Damien Jean-Rene Formey de Saint Louvent CCG-UNAM	Aprobada	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAMIEN JEAN RENÉ FORMEY DE SAINT LOUVENT | Fecha:2021-10-20 20:17:37 | Firmante

q9swBus+jM2DRx2lF4zXe4mW5GjigGK0z6GpX8idRyJnpQLy57BQirzZrHK6e+FYU+f1Jb/eL0CI/07NOlffYSJ0y8UqVGCm0MBLq9JuQtTLVU7ltWd5Fqm63ixfKOLla1f0WSqEILD
wWrdDPwB2b9u6zUgJ8IFu0BRP3qiyTKdv7An9vXCQx0o4AvUyrvgl7Vzx+k6oib74W2oA1d39YdahKZ+y+UX+l3DW5yQFos4zKaZt6fHRxTvtFLgmtBCmn8zb7i55zw1JTMYNZz
gYc6B5WUWI3+D5nclbvEc6SUTp8VpyG/sTLrfEKSP+sxRrxcl3anXb+ejgB0gmAQeA==

ELIZABETH CÓRDOBA MARTÍNEZ | Fecha:2021-10-21 07:22:15 | Firmante

jnbpJ84pEz0whnEN51wn5TifX2CTNWDbeV425zE2aalmcCTLVN88RobDOOmWtZnmYhFPHz77F/N0sQGxJnbalcEz6s6CtQzIvAkMmJGHFLozKUCAPBCinO3+/j82jDT/KR8j1
beV2Vte1z1NzkiDBx0hww/LBwaXRxeYSBSVl6Yi/548/ad8nJCOxlfz+Y Ao27V7mwnGL9OFC+4GKClBmQ7j/7F3hOwECDQjkg2XiMujdJZCqJBWloPAS7g23opP6OFM2Rv264s9
g3CcDs5S+YCEpgq9MHcq89shYR/8O46oboD7GQUxP8ayNXFDs8r2qleHKeqRzFk4DpJQRf3g==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2021-10-21 11:02:55 | Firmante

pvXtOfTvp/ZAD3+K49MuzlNxsKtkvGEbUb1JVqBUoZYkuRfzOyDFXpNA9h84mE1BPzhAUHBCinXk3hDseUCXNhLIJvuuW2Omm6nmYLIgAUMKQRiQZYm90LTu29v+SF03Bs
+A/YygA1OSQOQtsHD1W/+d+dLy6vi2ixZer6h0C1Nb4fsvSek5wTSFY2VWnKu2K4EZFOgRNV/tQoLPBtuRD0Oq2Lybv9y9YSmRXdEdToeFIUpBVki5+xaU7aJx4FJiPT5Csy0PI
CGDFslrSGCp6sXLnWtj5Uqm1BVlM0dx6x9eUkr/nOR9BL3clQCOrdibsz3GQn+ex2dZX7wUhg==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2021-10-22 16:05:59 | Firmante

U2dFLed6VbkCzUVVcLm3GvYD2xPIZmRZWyI8fH8ERT1nl+bqINxZg+u+smQv8QXEhKYcg+giKJTmsYLI3czcAJKS8pOhLv3JY8BLI9hgF5zGi9PnBghHX+TELwHUG4YBhjRPRi
me5sI2EQcbzuBDyMx7ea7EYiaA6T9dMTb8YMMtiyXGVhhGN5EiWIPoCoOL6mv09CEsbl/VpYHJPZsQ7ixVhJFk352TVRZRqGySij8LOfDbCdPjnqvdU5VWYUUEoJBRjvYMRZ
DnLtsMfLUYMPz9NwaUaoSxbYOP7T1LYuiyRFR9ZwdWSmnajs2vIphn3hdoR.J2IPadxc/zsqawQ==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2021-10-23 10:14:18 | Firmante

ws/X+e+nQB7nwoFbsL7mKynm1mUGrQQTtSTd/JQXyenqsQW4KiWgGbsFn2oz3AJTayfZv1ZtF7bjH+WTmUq/4lRgCyljQeWqiBCtUsLTB1JID6PD5x44T+9Jlqu0IZCXdQJiyh6
E59zkY/FAm+HbJZ4ToLFzSjw2J562tXHRGofdEXeczJna64VMriNJAsFdkbeU17CkEDxRjw/qHMCYVip7asMsGmsQQoWe8r73gqPXCZvW8PaOOgrT5StFflaH4qwELkpUGty3
v8hTg5FgBosz0c2bl1333GJnFpsxyei5meSIJWzXUUniMJO9e8SweDz1cro4IKulDenkk4aUA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UbeQICgS9

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NZunuiRmOM9Ye6bpMvRGeowpgNh6L1XM>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Caracterización funcional de los genes *ROPs* en el rearrreglo del citoesqueleto
en respuesta a la endosimbiosis bacteriana en *Lotus japonicus*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

YARENI MARLENE CRUZ FARFÁN

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Damien Jean-Rene Formey de Saint Louvent

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021

Conformación de jurado revisor de tesis

La Comisión Académica Interna del Posgrado en Ciencias en su reunión del 11 de noviembre de 2020 autorizó a la alumna Biol. Yareni Marlene Cruz Farfán presentar su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, defendiendo el proyecto de investigación titulado: “Caracterización funcional de los genes *ROPs* en el rearreglo del citoesqueleto en respuesta a la endosimbiosis bacteriana en *Lotus japonicus*”, quedando la conformación de su jurado revisor de la siguiente manera:

Dr. Ramón Alberto Batista García

Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM

Dra. Verónica Lira Ruan

Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez

Instituto de Biotecnología de la UNAM

Dr. Nelson Avonce Vergara

Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM

Dr. Damien Jean-Rene Formey de Saint Louvent

DIRECTOR DE TESIS

Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM

Lista de publicaciones relacionadas con la tesis

-

“Caracterización funcional de los genes *ROPs* en el rearrreglo del citoesqueleto en respuesta a la endosimbiosis bacteriana en *Lotus japonicus*”

Resumen

El nitrógeno (N) es esencial para el crecimiento y la producción agrícola de las plantas; sin embargo, la disponibilidad de éste es limitada en muchos suelos alrededor del mundo, lo que provoca un abuso de los fertilizantes industriales en las técnicas de agricultura moderna, omitiendo el fuerte impacto negativo que estas prácticas ocasionan al medio ambiente. Por esta razón, resulta fundamental identificar fuentes alternativas al uso de fertilizantes industriales; y la fijación biológica del nitrógeno podría ser una opción. Las leguminosas han evolucionado en una relación simbiótica con los rizobios, con la finalidad de fijar nitrógeno atmosférico. Estas bacterias entran a las células de la raíz a través de los pelos radicales, lo que requiere de una adecuada reorganización del citoesqueleto. Las proteínas Rho-GTPasas actúan como reguladores maestros de la organización del citoesqueleto, sin embargo, aún no se conoce a detalle su participación en el establecimiento de la simbiosis para la fijación del nitrógeno. Por lo que realizar la caracterización funcional de los nueve genes *ROPs* en *Lotus japonicus* permitió determinar su participación en estos procesos.

Este enfoque se desarrolló en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Las plantas fueron transformadas con construcciones que contenían una fusión transcripcional del promotor de cada *ROP* con el gen reportero GUS, lo que nos permitió elaborar un mapa espacio temporal de la expresión en la raíz; a la par de estos ensayos se realizó un análisis bioinformático de los perfiles de expresión de dichos genes en *Lotus* y otras leguminosas modelo. Mis resultados apuntan a que de los genes *ROPs* evaluados en este proyecto de investigación *LjROP6* y *LjROP5* podrían estar involucrados en las etapas tempranas de la simbiosis, debido a que presentan una expresión fuerte en los pelos radicales; mientras que *LjROP9*, *LjROP4* y *LjROP2* se expresan preferencialmente en nódulos, lo que nos lleva a hipotetizar que estos genes también podrían desempeñar un papel dentro de la simbiosis pero en las etapas relacionadas con la formación del nódulo o la presencia de estos.

Referencias bibliográficas

- Ferguson**, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D., y Gresshoff, P. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (1), 61–76.
- Hall**, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279 (5350), 209-514.
- Ladha**, J., Tirol-Padre, A., Reddy, C., Cassman, K., Verma, S., Powlson, D., ... Pathak, H. (2016). Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. *Scientific Reports*, 6 (19355), 1-9.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Centro de Ciencias Genómicas dependiente de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes a cargo de la Dra. Georgina Hernández Delgado; bajo la dirección del Dr. Damien Jean-Rene Formey de Saint Louvent.

El proyecto de investigación fue generosamente apoyado y financiado por varias instituciones; recibí una beca para estudios de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 929222), y el trabajo experimental fue financiado principalmente por donativos de CONACyT (A1-S-16129 y 253494) y del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IA202620 y IA200816).



Agradecimientos

Primeramente, me gustaría agradecer a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente dentro de sus aulas y por haberse convertido en una segunda casa para mí, a lo largo de estos dos años de maestría.

Agradezco a la Dra. Georgina Hernández Delgado, responsable del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes, por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en este laboratorio.

En especial agradezco al Dr. Ramón Suárez Rodríguez y a la Dra. Rosana Sánchez López, su apoyo técnico y recomendaciones fueron una pieza fundamental en la realización del proyecto.

Dra. Verónica Lira Ruan (Katerina) y Dr. Nelson Avonce Vergara, gracias por su magnífica labor como parte de mi comité tutorial y por compartir conmigo sus invaluable conocimientos y sugerencias para mejorar este proyecto.

Un trabajo de investigación no se puede llevar a cabo sin el apoyo, enseñanza y motivación de diversas personas, que con su granito de arena hicieron posible la realización de éste; en verdad muchas gracias al Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, a la Ing. Martha Torres, a Víctor Manuel Bustos Zagal y al Dr. Mario Ramírez Yáñez.

Dr. Alexandre Tromas, muchas gracias por su conocimiento, paciencia, consejos y exigencia; usted contribuyó de una manera notable en mi formación profesional en el área de la investigación y de la pedagogía; muchas gracias por la confianza otorgada desde mi llegada al laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes, siendo participe de mis logros como servicio social y posteriormente como tesista de licenciatura y encaminando mi formación como maestra en ciencias: MUCHAS GRACIAS ALEX.

Por último pero no menos importante agradezco al Dr. Damien Jean-Rene Formey de Saint Louvent, quien asumió la dirección de este proyecto de tesis, aportando un nuevo enfoque científico que contribuyo a renovar la energía de trabajo, la motivación y las expectativas puestas en este proyecto. Gracias a sus sugerencias, correcciones y exigencia en este corto periodo de tiempo logré desarrollar aún más mis capacidades técnicas y de razonamiento científico; sin todo su apoyo y paciencia esto no hubiera sido posible: MUCHAS GRACIAS.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2. 1. El aumento poblacional y la demanda mundial en la producción de alimentos	2
2. 2. Nitrógeno: Elemento esencial para la agricultura.....	2
2. 2. 1. Uso de fertilizantes nitrogenados	3
2. 2. 2. Consecuencias del uso de fertilizantes nitrogenados	3
2. 2. 3. Fuentes alternativas de nitrógeno.....	3
2. 3. Fijación biológica del nitrógeno	4
2. 3. 1. Las leguminosas y la fijación biológica del nitrógeno.....	4
2. 3. 2. Establecimiento de la simbiosis	5
2. 4. El citoesqueleto y el papel de la actina	7
2. 5. La familia Rho-GTPasas.....	8
2. 5. 1. Las proteínas ROP en plantas.....	8
2. 5. 2. Proteínas ROP en <i>Lotus japonicus</i>	10
2. 6. Promotores	11
2. 6. 1. Características intrínsecas de los promotores.....	12
2. 7. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	13
2. 8. Línea mutante <i>rop3</i>	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos.....	17
5. 1. Objetivo general.....	17
5. 2. Objetivos específicos	17
6. Metodología.....	18
6. 1. Material biológico.....	18
6. 2. Comparación de la acumulación de transcritos de los genes <i>ROP</i> en el fondo <i>genético</i> mutante <i>rop3</i> y silvestre.....	18
6. 2. 1. Esterilización y germinación de semillas de <i>Lotus japonicus</i>	18
6. 2. 2. Trasplante de plántulas	19
6. 2. 3. Inoculación de las raíces de <i>Lotus japonicus</i> con <i>Mesorhizobium loti</i>	19
6. 2. 4. Extracción de ARN de raíces de <i>Lotus japonicus</i>	20
6. 2. 5. Síntesis de ADNc.....	20

6. 2. 6. RT-qPCR	20
6. 3. Análisis y comparación de los perfiles de expresión de los genes <i>ROP</i>	21
6. 3. 1. Determinación del número de genes <i>ROP</i> para cada especie de leguminosa analizada	21
6. 3. 2. Análisis filogenético de las secuencias proteicas de la familia ROP en leguminosas	22
6. 3. 3. Consulta de los perfiles de expresión en bases de datos.....	22
6. 4. Análisis de la actividad de los promotores de los genes <i>LjROP in vivo</i> en raíces transformadas de <i>Lotus japonicus</i>	23
6. 4. 1. Análisis bioinformático de las secuencias promotoras de los genes <i>LjROP</i>	23
6. 4. 2. Construcción del plásmido binario pC GW mCherry 3x Venus.....	23
6. 4. 3. Construcción del plásmido binario pC GW mCherry GUS	24
6. 4. 4. Protocolo para generación de “hairy roots”	25
6. 4. 5. Transformación de plantas	25
6. 4. 6. Transferencia de plántulas a sustrato	26
6. 4. 7. Evaluación de la actividad de los promotores	26
7. Resultados y discusión	27
7. 1. Comparación de la acumulación de transcritos de los genes <i>ROP</i> en el fondo <i>genético</i> mutante <i>rop3</i> y silvestre.....	27
7. 2. Análisis y comparación de los perfiles de expresión de los genes <i>ROP</i>	29
7. 2. 1. Perfil de expresión de los genes <i>ROP</i> en otras leguminosas	35
7. 3. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias promotoras de los <i>LjROP</i>	45
7. 4. Evaluación de la actividad de los promotores <i>LjROP in vivo</i>	48
7. 5. Ensayo histoquímico de GUS	50
8. Conclusiones	55
9. Perspectivas	58
10. Anexos	60
I. Composición de la solución nutritiva B&D	60
II. Composición del medio TY (Tryptone Yeast).....	61
III. Mapa del plásmido pMiniT.....	61
IV. Protocolo de transformación de bacterias competentes mediante choque térmico	62
V. Mapa del plásmido pC GW mCherry_ <i>LjROP3p</i> -GUS.....	63
VI. Protocolo para la transformación de <i>Agrobacterium</i> mediante electroporación	63
VII. Oligonucleótidos para RT-qPCR	64
VIII. Oligonucleótidos para añadir sitios de corte enzimático a las secuencias promotoras	65

IX. Oligonucleótidos par amplificar el gen <i>GUS</i>	65
X. Soluciones y protocolo para tinción GUS.....	66
XI. Números de acceso para los genes ROP en distintas especies vegetales	68
XII. Fotografías del ensayo histoquímico de GUS	69
11. Referencias bibliográficas	74

1. Introducción

El aumento mundial de la población ha provocado que en las últimas décadas la demanda comercial de alimentos se haya incrementado, por lo que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha pronosticado que para el año 2050 será necesario acrecentar la producción de alimentos para cubrir las necesidades de consumo humano y animal.

En la actualidad, la agricultura de alto rendimiento se ve seriamente afectada por la disponibilidad de nutrientes en el suelo, de los cuales el nitrógeno es indispensable para dicha actividad, debido a que su deficiencia limita el crecimiento y producción de plantas.

Este déficit se ha solucionado parcialmente mediante el uso de fertilizantes nitrogenados; los cuales han logrado aumentar la producción agrícola, pero al mismo tiempo han provocado consecuencias ambientales negativas, severas y a largo plazo. Por lo que se ha planteado la necesidad de buscar nuevas alternativas que puedan sustituir el uso de fertilizantes nitrogenados, siendo la fijación biológica del nitrógeno una opción.

Plantas como las leguminosas, han evolucionado en una relación simbiótica con bacterias específicas del suelo, con la finalidad de fijar nitrógeno atmosférico. Dichas bacterias entran a las células de la raíz por los pelos radicales, lo que requiere de una adecuada reorganización del citoesqueleto. Las proteínas Rho-GTPasas (ROP en plantas) son conocidas por regular el arreglo del citoesqueleto y por la evidencia existente del papel que desempeñan en la simbiosis para fijar nitrógeno.

Debido a esto, en el Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, se pretende determinar cuáles de los nueve miembros de la familia ROP, podrían desempeñar un papel funcional en la simbiosis; lo cual se llevará a cabo, entre otros, mediante la caracterización espacio - temporal de los genes *ROP* en respuesta a la endosimbiosis bacteriana en *Lotus japonicus*.

2. Antecedentes

2. 1. El aumento poblacional y la demanda mundial en la producción de alimentos

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), pronosticó que la población mundial aumentará en más de un tercio, o 2,300 millones de personas, entre 2009 y 2050 (FAO, 2009). Estas tendencias apuntan a que la demanda comercial de alimentos continuará creciendo. Se calcula que la demanda de cereales, destinados tanto al consumo humano como animal, alcanzará unas 3 mil millones de toneladas, en 2050, frente a la cifra actual de cerca de 2,1 mil millones de toneladas (FAO, 2009). Asimismo, las proyecciones de la FAO (2009) muestran que para alimentar a una población mundial de 9,100 millones de personas en 2050 sería necesario aumentar la producción de alimentos en un 70%.

2. 2. Nitrógeno: Elemento esencial para la agricultura

El nitrógeno (N) es un elemento indispensable para la agricultura contemporánea de alto rendimiento (Ladha *et al.*, 2016). Al mismo tiempo es un nutriente crítico limitante para el crecimiento y la producción de plantas (Wagner, 2011), debido a que es un componente importante de la clorofila, los aminoácidos, el ATP, los ácidos nucleicos y diversas proteínas vegetales (Ladha *et al.*, 2016).

Sin embargo, la disponibilidad del nitrógeno es limitada en muchos suelos; a pesar de que la atmósfera terrestre consta de 78.1% de nitrógeno en estado gaseoso (N₂), las plantas son incapaces de usar esta forma de nitrógeno (Ferguson *et al.*, 2010). Con la finalidad de compensar este déficit de nitrógeno, la agricultura moderna, ha sido altamente dependiente del uso de fertilizantes industriales nitrogenados, que permiten lograr una mayor productividad en los cultivos (Ferguson *et al.*, 2010).

2. 2. 1. Uso de fertilizantes nitrogenados

Ladha y colaboradores (2016), indican que, sin el uso de los fertilizantes nitrogenados, la producción mundial de alimentos solamente podría cubrir la demanda de menos de la mitad de la población actual de 7.3 millones. Esta situación ha provocado que en años recientes el precio de los fertilizantes nitrogenados haya incrementado dramáticamente (Ferguson *et al.*, 2010). Alrededor de un 50% del nitrógeno que se produce industrialmente se aplica como fertilizante a los tres principales cultivos de cereales (maíz, 16%; arroz, 16%; y trigo, 18%) (Ladha *et al.*, 2016).

2. 2. 2. Consecuencias del uso de fertilizantes nitrogenados

Las actividades agrícolas, incluyendo el cultivo y las prácticas de manejo de suelos, se identifican como una fuente potencial de emisión de gases de efecto invernadero. De manera más notable las prácticas de fertilización con N han sido reconocidas como grandes contribuidoras al efecto invernadero (Watts *et al.*, 2015).

Sumado a lo anterior, la aplicación de fertilizantes químicos es en gran medida un proceso ineficiente (Ferguson *et al.*, 2010), porque formas reactivas de nitrógeno (amonio, nitrato y óxido de nitrógeno) se liberan al ambiente (Ladha *et al.*, 2016). Además de que alrededor de un 30 a 50 % del fertilizante nitrogenado aplicado se pierde por lixiviado, causando serios problemas ambientales tales como la eutrofización del agua, cambio climático y pérdida de la biodiversidad (Ladha *et al.*, 2016; Vitousek *et al.*, 1997), solo por citar algunos ejemplos.

2. 2. 3. Fuentes alternativas de nitrógeno

Debido a que la mayor parte de los cultivos en el mundo depende de la aplicación de fertilizantes nitrogenados, es crucial identificar nuevas fuentes alternativas de nitrógeno y prácticas de manejo para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero e incrementar la eficiencia del uso de este elemento tan indispensable (Watts *et al.*, 2015).

Dentro de las fuentes de nitrógeno más comunes, además de los fertilizantes y las reservas de dicho elemento en el suelo, pueden incluirse el estiércol, los residuos de cultivos y la deposición atmosférica (por humedad y lluvia) (Ladha *et al.*, 2016). De igual forma la fijación biológica del nitrógeno es una alternativa a los fertilizantes nitrogenados (Ferguson *et al.*, 2010); y desarrollar cultivos con la capacidad para fijar nitrógeno biológicamente puede ayudar a los agricultores a superar las limitaciones de este elemento e incrementar la productividad de sus cultivos sin la necesidad de comprar fertilizantes nitrogenados (Bøckman, 1997).

2. 3. Fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno la realiza un grupo especializado de procariontas. Estos organismos utilizan el complejo enzimático conocido como nitrogenasa para catalizar la conversión del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3) que es una forma del nitrógeno que las plantas pueden asimilar (Ferguson *et al.*, 2010; Wagner, 2011).

El grupo de procariontas que fijan nitrógeno incluye a organismos acuáticos, como las cianobacterias, bacterias del suelo de vida libre, tales como *Azotobacter*, bacterias que forman relaciones simbióticas con las plantas, como *Azospirillum*, y la familia Rhizobiaceae, que comprende entre otros a los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, que se caracterizan por presentar la capacidad de establecer relaciones simbióticas con el grupo de las leguminosas (Wagner, 2011; Ferguson, 2017).

2. 3. 1. Las leguminosas y la fijación biológica del nitrógeno

Las plantas leguminosas, miembros de la familia Fabaceae, son catalogadas en segundo lugar de importancia alimenticia para los humanos después de las gramíneas (Graham & Vance, 2003); han evolucionado en una relación simbiótica con bacterias específicas del suelo, conocidas como rizobios con la finalidad de fijar nitrógeno (Ferguson *et al.*, 2010; GavriloVIC *et al.*, 2016); desarrollando nódulos que son órganos especializados donde se lleva a cabo este proceso (Graham & Vance, 2003).

Debido a que el nitrógeno es un factor clave limitante para el crecimiento y desarrollo de la planta, la habilidad de las leguminosas para entrar en simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno les proporciona una ventaja evolutiva y distintiva sobre las otras especies de plantas en suelos deficientes en nitrógeno (Ferguson *et al.*, 2010). Esto se debe a que la fijación biológica es equivalente a la fertilización con este elemento, y elimina la necesidad de utilizar fertilizantes nitrogenados (Bøckman, 1997).

Transferir la capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno a otros cultivos podría complementar y eventualmente sustituir el uso de fertilizantes nitrogenados, lo cual ayudaría a la sostenibilidad de la agricultura en un futuro, y a disminuir las consecuencias negativas del uso de los fertilizantes (Bøckman, 1997).

2. 3. 2. Establecimiento de la simbiosis

El establecimiento de la simbiosis se inicia en las raíces de la planta hospedera que exudan compuestos denominados flavonoides dentro de la rizosfera (Ferguson *et al.*, 2010). Este exudado determina de manera parcial la especificidad de la relación simbiótica con cada especie de rizobio, que responde de manera específica a ciertos tipos de flavonoides (Ferguson *et al.*, 2010). En la **Tabla 1** se citan algunos ejemplos de la relación específica entre las plantas y las bacterias simbióticas:

Tabla 1

Relación específica planta-bacteria

Cultivo	Bacterias de nodulación	Referencia
Alfalfa	<i>Sinorhizobium melilotii</i>	Wagner, 2011
Frijol	<i>Rhizobium leguminosarum bv phaseoli</i> <i>Rhizobium tropici</i>	
Trébol	<i>Rhizobium leguminosarum bv trifolii</i>	
Lotus	<i>Mesorhizobium loti</i>	
Chícharo	<i>Rhizobium leguminosarum bv viceae</i>	
Soya	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Rhizobium fredii</i>	
Sesbania	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	

La percepción de los flavonoides atrae a los rizobios hacia la raíz (quimiotaxis) y activa la expresión de genes de nodulación que conducen a la producción y secreción de lipochitoooligosacaridos, también conocidos como factores NOD, que se convierten en una señal para el inicio de la formación del nódulo en la planta hospedera (Ferguson *et al.*, 2010; Graham & Vance, 2003).

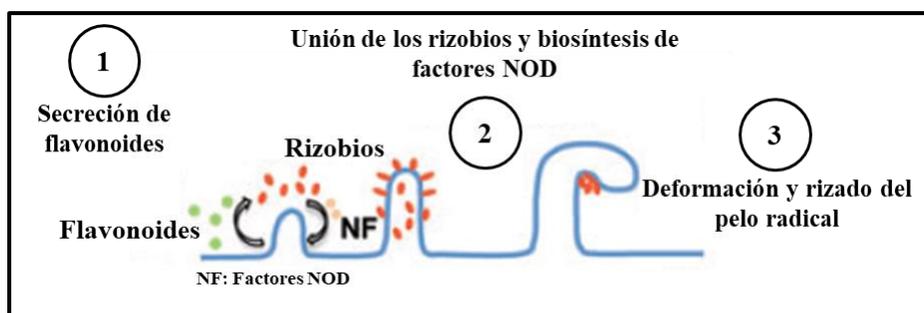


Figura 1. Comunicación entre los rizobios y la planta hospedera. Los pelos radicales exudan flavonoides, dichos compuestos atraen a los rizobios compatibles y estimulan la producción de factores NOD; por último, el pelo radical se deforma y una micro-colonia de bacterias se invagina hacia al interior del pelo radical. (Modificada de Ferguson *et al.*, 2010).

Ferguson y colaboradores (2010) señalan que la punta de los pelos radicales emergentes es uno de los blancos principales para el inicio de la infección de los rizobios. Pocos días después del inicio de la infección, es posible observar la formación de primordios de nódulos en el córtex de la raíz. Conforme el desarrollo del nódulo progresa, la bacteria invade el tejido primordial central a través de hilos de infección ramificados (Gavrilovic *et al.*, 2016). En el nódulo, la bacteria cataliza la reducción de N_2 en amonio empleando el complejo enzimático nitrogenasa (Ferguson *et al.*, 2010).

La entrada de los rizobios en la célula vegetal es un proceso activo que necesita la invaginación de la membrana; y como varios tipos de procesos similares, requiere de un rearrreglo del citoesqueleto para guiar vesículas y permitir el cambio de forma de la célula (Yokota *et al.*, 2009). Es importante resaltar que diversos estudios indican que los factores NOD tienen un papel significativo en la organización del citoesqueleto en los pelos radicales para permitir su reorientación (Liu *et al.*, 2010; Timmers, 2008). De igual forma, Downie (2014) apunta que el desarrollo de los hilos de infección durante el establecimiento de la

simbiosis requiere de la inducción de un cambio conformacional en el citoesqueleto de actina, lo cual provocará la polimerización de la actina a través de la acción del complejo SCAR/WAVE.

2. 4. El citoesqueleto y el papel de la actina

Fletcher y Mullins (2010) señalan que el citoesqueleto está conformado por tres principales polímeros estructurales, los filamentos de actina, los microtúbulos y un grupo de polímeros conocidos colectivamente como filamentos intermedios (ausentes en plantas). En su conjunto controlan la forma y la mecánica de las células eucariotas. Estos polímeros están organizados en redes que resisten la deformación y tienen roles importantes en la organización y el mantenimiento de la integridad de los compartimientos intracelulares (Fletcher & Mullins, 2010).

Asimismo, el citoesqueleto tiene la capacidad de reorganizarse en respuesta a una amplia variedad de estímulos, incluyendo la calidad de la luz, la presión, el estrés osmótico, el cambio de temperatura, el ataque de patógenos, entre otros (Timmers, 2008). El rol de la actina en estos procesos está estrechamente regulado a través del complejo ARP2/3, que funge como un iniciador de la polimerización de la actina, que a su vez promueve la formación de filamentos ramificados de actina; en levaduras. El complejo ARP2/3 se regula a su vez por el complejo SCAR/WAVE (Pollitt & Insall, 2009).

Las mutaciones que afectan *NAPI*, *PIR1* (subunidades del complejo SCAR/WAVE) y *ARPCI* (subunidad del complejo ARP2/3) en leguminosas, bloquean la mayoría de las infecciones por rizobios, demostrando que para el inicio de la formación del hilo de infección, es un requisito indispensable la reorganización del citoesqueleto (Downie, 2014).

Hall (1998) menciona que, en células de mamíferos, miembros de la familia de proteínas de tipo Rho-GTPasas, han surgido como reguladores clave del citoesqueleto de actina, por lo que entender los mecanismos bioquímicos que controlan la organización de la actina se ha convertido en un tema de estudio importante.

2. 5. La familia Rho-GTPasas

Los primeros estudios sobre las proteínas Rho-GTPasas demostraron que se encuentran implicadas en el control y regulación de diversos procesos de señalización celular, incluyendo la regulación de la expresión genética para la síntesis de la pared celular, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la endocitosis, la exocitosis, la citocinesis, la progresión del ciclo celular, la diferenciación celular en varios organismos eucariotas y la regulación de la organización del citoesqueleto de actina (Yang, 2002). Se sabe que en levaduras las Rho-GTPasas tienen un papel como regulador maestro de los complejos SCAR/WAVE y ARP2/3 (Goley & Welch, 2006).

2. 5. 1. Las proteínas ROP en plantas

En plantas, la familia Rho-GTPasa está representada por una única clase de proteínas llamadas ROP (Rho-GTPasa en Planta), estas proteínas son muy similares a los miembros de la familia Rho en animales y levaduras (Berken, 2006); están conformadas por alrededor de 200 aminoácidos con un peso molecular de 21 a 24 kilodaltons aproximadamente. Su principal elemento estructural es el dominio G, éste contiene 5 motivos altamente conservados denominados G-box-motifs (G1-G5), los cuales son esenciales para la asociación de iones de Mg^{2+} y para la unión con GDP o GTP (Berken & Wittinghofer, 2008).

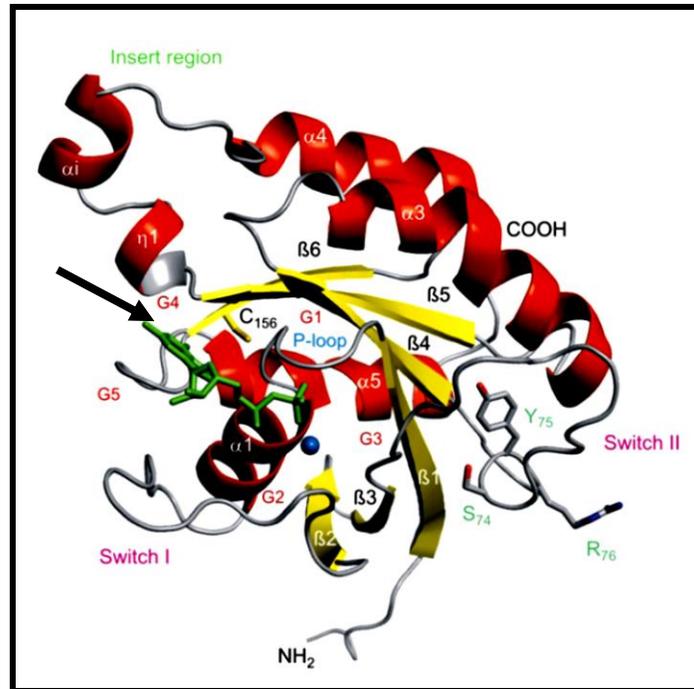


Figura 2. Diagrama de Ribbon de la estructura 3D de la proteína ROP9 de *Arabidopsis thaliana*, donde se muestran los motivos G1 – G5 y el GTP (color verde) señalado con una flecha. (Tomada de Berken & Wittinghofer, 2008).

Estas GTPasas funcionan como un interruptor molecular binario, que enciende y apaga las vías de señalización intracelular mediante un ciclo de unión al GDP (forma inactiva) y otro de unión al GTP (forma activa) (Liu *et al.*, 2010).

La investigación del rol de las proteínas ROP en plantas comenzó con el hallazgo de éstas en los tubos polínicos del chícharo (*Pisum sativum*) (Yang, 2002). Desde entonces algunos genes de las proteínas ROP se han identificado en ciertas especies de plantas incluyendo *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Gossypium hirsutum*, *Vitis vinifera*, *Lotus japonicus*, *Medicago sativa* y *Phaseolus vulgaris* (Blanco *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). La evidencia acumulada apunta a que las ROP están involucradas en la transducción de señales que controlan varios procesos del desarrollo, tales como el crecimiento celular polarizado, la morfogénesis celular, la señalización hormonal, la defensa contra patógenos y las respuestas ante la ausencia de oxígeno (Liu *et al.*, 2010). De igual forma, se ha investigado el papel de las proteínas ROP en la regulación del crecimiento de

los tubos polínicos y los pelos radicales, a través de la regulación de la organización de la actina (Liu *et al.*, 2010; Yang, 2002).

2. 5. 2. Proteínas ROP en *Lotus japonicus*

Lotus japonicus es una especie perteneciente a la familia Fabaceae con un ciclo de vida corto, de 2 a 3 meses, autopolinizable; tiene un genoma de 472 Mb y cuenta con 6 cromosomas (Handberg & Stougaard, 1992; Yokota *et al.*, 2009).

Tromas y colaboradores (datos preliminares no publicados) trabajaron exhaustivamente para la identificación de nueve miembros pertenecientes a la familia ROP en el genoma de la leguminosa modelo *L. japonicus*; estos se encuentran altamente conservados y se cree que podrían estar involucrados en el proceso de simbiosis. Los miembros de esta familia se nombraron siguiendo la nomenclatura propuesta para *Medicago* (*LjROP1*, *LjROP2*, *LjROP3*, *LjROP4*, *LjROP5*, *LjROP6*, *LjROP8*, *LjROP9* y *LjROP10*), mediante un análisis filogenético de estas proteínas en *Arabidopsis*, *Medicago* y *Lotus* (Tromas *et al.*, datos preliminares no publicados).

En 2016, Ke y colaboradores reportaron la identificación de diez miembros de la familia ROP en el genoma de *L. japonicus*, mediante un análisis filogenético de las secuencias proteicas de las ROP en *Arabidopsis*. Por lo que de inmediato en nuestro grupo de investigación se prosiguió a realizar la confirmación de estos datos; se utilizaron los números de acceso publicados en el artículo de Ke y colaboradores, los cuales mediante el uso de la plataforma en línea Lotus Base / Tools / Genome Browser, nos dieron la localización exacta de cada gen citado en el artículo.

Tras este análisis se determinó que dos de los genes propuestos por Ke y colaboradores, *LjROP2*- No. de acceso: Lj1g3v2185260 y *LjROP3* – No. de acceso: Lj1g3v2185270, son en realidad dos isoformas de un mismo gen ubicadas en el mismo locus; lo que daría en realidad un total de nueve miembros identificados y no diez como ellos lo proponen.

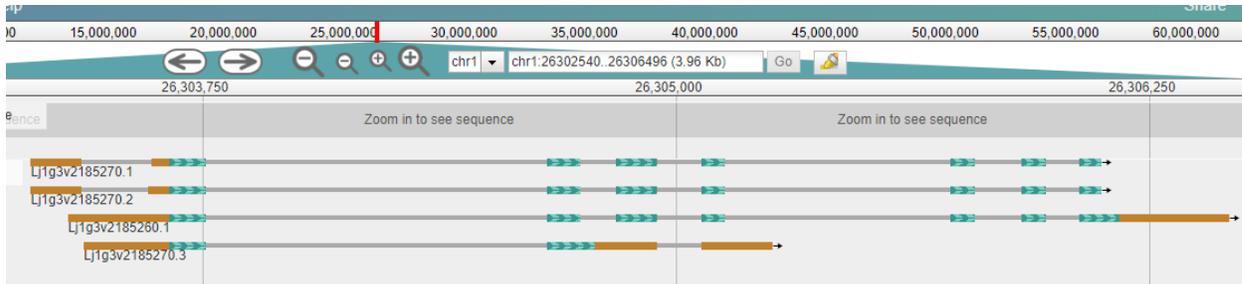


Figura 3. Imagen de la página en línea Lotus Base / Tools / Genome Browser, donde se muestra el resultado de la búsqueda de los números de acceso de *LjROP2* - Lj1g3v2185260 y *LjROP3* - Lj1g3v2185270; demostrando que se trata de dos isoformas de un mismo gen situadas en el mismo locus. (Tomada de LOTUS BASE <https://lotus.au.dk/>).

2. 6. Promotores

La estructura modular de los promotores nucleares de plantas consiste en una región distal (secuencia de activación río arriba; UAS, por sus siglas en inglés) y en una región proximal (promotor mínimo), siendo la región proximal la que incluye la caja TATA (Dey *et al.*, 2015); la cual es una secuencia de ADN que indica el comienzo de la transcripción; dicha caja se nombró de esta manera por su secuencia altamente conservada (TATAAA) (Porto *et al.*, 2014; Peremarti *et al.*, 2010). La caja TATA es capaz de definir la dirección de la transcripción y también indica la hebra de ADN que será transcrita. Muchos genes eucariotas conservan la caja TATA localizada de 25 a 35 pares de bases antes del inicio de la transcripción de un gen (Porto *et al.*, 2014; Peremarti *et al.*, 2010).

La actividad del promotor es afectada por otros elementos del ADN como los enhancers, silencers e insulators (Dey *et al.*, 2015). Los enhancers son dominios específicos de ADN con los cuales interactúan las proteínas de unión al ADN, aumentando la expresión genética. Su funcionalidad es independiente a su posición u orientación (Dey *et al.*, 2015). En contraste, los elementos silenciadores (silencers) del ADN se encargan de reclutar la maquinaria celular para silenciar la expresión genética. Los insulators, por su parte, son elementos del ADN que funcionan como un bloque que ocasiona interferencia entre un enhancer no relacionado o un silenciador presente en el dominio vecino (Dey *et al.*, 2015).

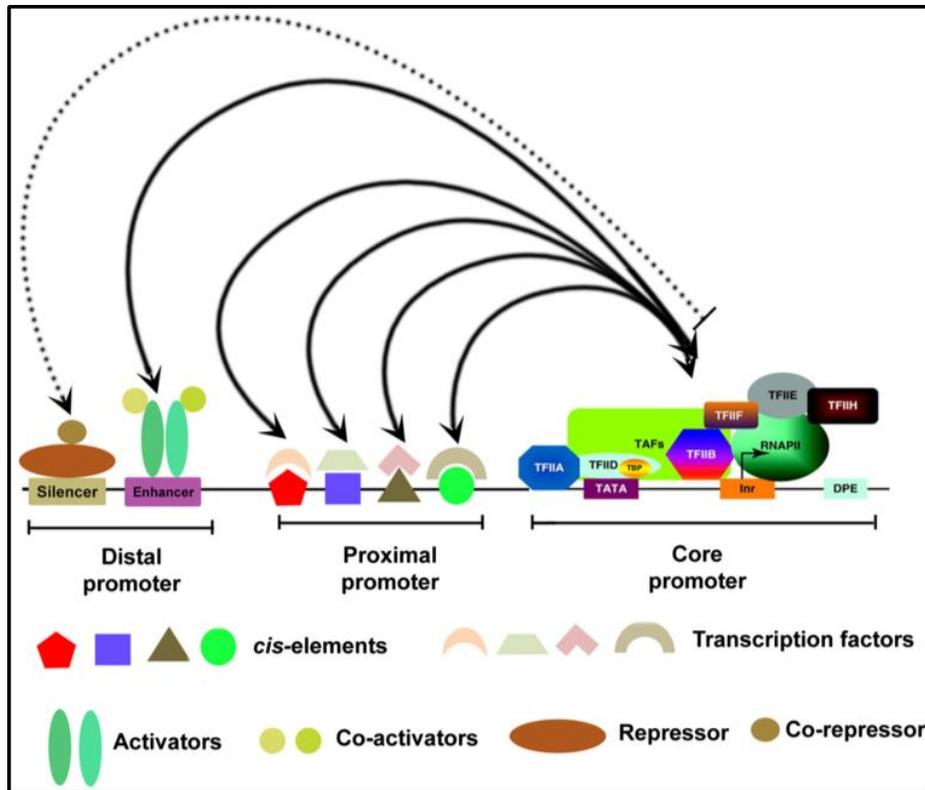


Figura 4. Complejo de pre-iniciación en un promotor mínimo que contiene la caja TATA, el iniciador (Inr) y el elemento río abajo del promotor (DPE), en sus respectivas posiciones. Se muestran también las regiones proximales y distales del promotor. (Tomada de Dey *et al.*, 2015).

En plantas, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV35S, por sus siglas en inglés) ha sido utilizado para varias aplicaciones en biología molecular, tales como la sobreexpresión (por su alta actividad transcripcional) y la expresión ubicua en la mayoría de los tipos celulares (Benfey *et al.*, 1990).

2. 6. 1. Características intrínsecas de los promotores

Una característica común de un promotor es que se puede conseguir una medida cuantitativa de la tasa de transcripción obtenida desde una secuencia de promotor dada. Sin embargo, la tasa de transcripción no es intrínseca a los promotores, porque estos son altamente dependientes del contexto en el cual son cuantificados: la molécula de ADN, la célula hospedera y las condiciones experimentales (Rudge *et al.*, 2015). Por lo tanto, una verdadera

característica intrínseca de un promotor es una medida cuantitativa de la transcripción que es específica de un promotor dado y consistente en una gama de contextos en constante cambio (Rudge *et al.*, 2015).

Para cuantificar la actividad de los promotores es habitual el empleo de genes reporteros fluorescentes, fusionados río abajo del promotor del gen de interés; estos genes reporteros resultan convenientes porque codifican para una simple proteína y no requieren substratos o precursores para generar una señal cuantificable (Rudge *et al.*, 2015).

2. 7. Transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

Las plantas transgénicas representan una herramienta invaluable para los estudios moleculares, genéticos, bioquímicos y fisiológicos de sobreexpresión o silenciamiento de genes, mutagénesis basada en transposones, localización subcelular de proteínas o caracterización de promotores (Homrich *et al.*, 2012).

Actualmente el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* ha sido utilizado con gran éxito para generar plantas transgénicas de manera estable (Ma, 2018). La transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* permite la formación de raíces pilosas o “hairy roots”, las cuales crecen pleiotrópicamente, de manera rápida y altamente ramificada (Homrich *et al.*, 2012).

Agrobacterium rhizogenes tiene la capacidad de transferir un segmento de ADN (ADN-T) desde el plásmido bacteriano Ri (“Root inductor” o inductor de raíz) o desde un vector binario que contenga un gen de interés particular, el cual será integrado en el genoma de la planta huésped y expresará sus genes codificados (Ma, 2018; Homrich *et al.*, 2012). Las “hairy roots” que se obtienen pueden propagarse clonalmente en un medio de cultivo apropiado. Además, gracias a este tipo de sistema se pueden generar “plantas quiméricas”, es decir, plantas con tallos y brotes silvestres y raíces transgénicas (Homrich *et al.*, 2012).

Cada “hairy root” transgénica representa un evento de transformación independiente, y se pueden obtener y analizar un gran número de transformantes; por otra parte, cabe destacar que la principal ventaja de este sistema es que se requiere de un período de tiempo relativamente corto (aproximadamente 6-8 semanas) para poder detectar genes y promotores potenciales en los tejidos transformados establemente (Homrich *et al.*, 2012).

La transformación mediada por *A. rhizogenes* se ha convertido en una herramienta poderosa para los estudios funcionales de genes y biología de la raíz debido a su metodología rápida y sencilla (Homrich *et al.*, 2012).

2. 8. Línea mutante *rop3*

En *Lotus japonicus* se ha identificado un retrotransposón de tipo LTR (“Long Terminal Repeat” o Repetición Terminal Larga) LORE1 (Lotus Retrotransposón 1); LORE1 es un retrotransposón endógeno de bajo número de copias (Madsen *et al.*, 2005) que presenta una preferencia por las regiones génicas, especialmente exones (Fukai *et al.*, 2012). Tomando en cuenta estas propiedades, LORE1 se ha usado ampliamente para generar una extensa población de mutantes de inserción en *L. japonicus*, ecotipo Gifu; lo que ha permitido contar con mutantes para casi cualquier gen.

A estos grandes compendios de mutantes de inserción se puede tener acceso mediante plataformas en línea como Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>); las cuales permiten a los usuarios conocer el sitio potencial de la inserción del retrotransposón, y de esta manera, poder ordenar semillas de líneas mutantes de interés; las cuáles pueden ser empleadas en distintos estudios, por ejemplo, de genética reversa.

Para el caso particular del grupo de investigación se tuvo la fortuna de encontrar líneas mutantes para *rop1*, *rop3*, *rop5*, *rop6* y *rop10*. Las líneas *rop1*, *rop3*, *rop6* y *rop10* fueron genotipificadas y genotipificadas por un estudiante del grupo, Jesús Daniel Castro Chilpa, obteniendo resultados interesantes para la línea mutante *rop3* (Castro, 2019).

Se observó que a siete días después de la inoculación con la bacteria simbiótica *M. loti*, la línea mutante *rop3* presentó una disminución significativa en el número de eventos de nodulación, además de una diferencia notable en el promedio de hilos de infección comparado con las plantas silvestres (control) (Castro, 2019). Lo que podría indicar un papel de *ROP3* en la simbiosis. Por lo que surgió el interés de comprobar si la acumulación de los transcritos de *ROP3* estaba siendo afectada en este mutante, para poder así relacionar el fenotipo observado con la pérdida de *ROP3*; asimismo se propuso cuantificar la acumulación de transcritos del resto de los *ROP* en el fondo mutante, para determinar si la pérdida de *ROP3* generaba un impacto en el resto de los miembros de la familia *ROP*.

3. Justificación

Las leguminosas han evolucionado en una relación simbiótica con los rizobios, con la finalidad de fijar nitrógeno atmosférico. Estas bacterias entran a las células de la raíz a través de los pelos radicales, lo que requiere de una adecuada reorganización del citoesqueleto. Las proteínas Rho-GTPasas actúan como reguladores maestros de la organización del citoesqueleto, sin embargo, aún no se conoce a detalle su participación en el establecimiento de la simbiosis para la fijación del nitrógeno. Por lo que caracterizar la expresión espacio-temporal de los genes *ROP* en *Lotus japonicus* permitirá seleccionar los mejores candidatos para evaluar su participación en estos procesos.

4. Hipótesis

Evaluar la actividad de los promotores *ROP in vivo*, en raíces transformadas de *L. japonicus*, antes y después de la inoculación con *M. loti*, nos permitirá identificar de manera detallada a los genes *ROP* que podrían desempeñar un papel durante la entrada de las bacterias simbióticas.

5. Objetivos

5. 1. Objetivo general

Caracterizar la expresión espacio - temporal de los genes *ROP* durante las etapas tempranas de la simbiosis.

5. 2. Objetivos específicos

- Comparar la acumulación de transcritos de los genes *ROP* en el fondo *genético* mutante *rop3* y silvestre.
- Contrastar los datos publicados de acumulación de transcritos de los *ROP* con los datos de RT-qPCR ya obtenidos.
- Analizar la actividad de los promotores de los *ROP in vivo* en raíces transformadas de *Lotus japonicus*.

6. Metodología

6. 1. Material biológico

Para el presente trabajo de investigación se utilizó la leguminosa modelo *Lotus japonicus*, ecotipos Gifu y MG20. Las plantas se cultivaron con un fotoperiodo de 16/8 horas luz-obscuridad en un rango de temperatura de 23 a 25°C.

También se emplearon las siguientes especies bacterianas:

Agrobacterium rhizogenes – Cepa AR10

Escherichia coli – Cepa TOP10

Mesorhizobium loti – Cepa MAFF 303099 (Expresando la proteína fluorescente *DsRed*)

Mesorhizobium loti – Cepa MAFF 303099 (Expresando el gen *LacZ*)

6. 2. Comparación de la acumulación de transcritos de los genes *ROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre

6. 2. 1. Esterilización y germinación de semillas de *Lotus japonicus*

Como primer paso se realizó la escarificación manual de las semillas de *L. japonicus* (ecotipo Gifu, fondo genético *rop3* y silvestre), utilizando ácido sulfúrico y agitando con vórtex durante 10 minutos; seguido a esto las semillas fueron lavadas 10 veces con dH₂O estéril, a continuación, se sumergieron en solución I (Alcohol al 75% y 0.1% de SDS); posteriormente se lavaron con dH₂O estéril, continuando con una inmersión en solución II (Cloro al 20% y 0.1% de SDS), se finalizó con varios lavados con dH₂O estéril.

Las semillas permanecieron en dH₂O estéril con agitación durante una noche; después se colocaron en papel filtro estéril dentro de una caja Petri, adicionando un poco de dH₂O estéril para mantenerlas hidratadas. Por último, fueron colocadas en el cuarto de cultivo.

6. 2. 2. Trasplante de plántulas

Una vez germinadas las semillas y después de 7 días de crecimiento dentro de las cajas, se prosiguió a trasplantar las plántulas en macetas estériles; se empleó vermiculita estéril como sustrato. Las macetas estuvieron cubiertas con bolsas plásticas durante 7 días; al segundo día después de trasplantar las plántulas a las macetas, se realizó un corte pequeño en la bolsa para permitir la entrada de aire; al día siguiente se abrió un poco más dicho orificio; este procedimiento se repitió en los días posteriores hasta llegar al séptimo día, donde se retiró por completo la bolsa plástica.

Las plántulas fueron regadas con solución nutritiva B&D mínima cuando se consideró necesario de acuerdo con la humedad observada en el sustrato.

6. 2. 3. Inoculación de las raíces de *Lotus japonicus* con *Mesorhizobium loti*

De cuatro a cinco días antes de la inoculación, fue necesario crecer la bacteria simbiótica *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 (*LacZ*), proveniente de un stock glicerol, en cajas con medio de selección (TY sólido y tetraciclina).

Posteriormente, se realizó un cultivo líquido con medio TY y tetraciclina; con ayuda de un asa metálica estéril, se adicionó una muestra de la bacteria *M. loti* proveniente de las cajas sembradas con anterioridad. Dicho cultivo se incubó por 2 días, con agitación y a una temperatura de 28° C. Se ajustó la concentración para llegar a un valor de 0.8 de absorbancia a 600nm. Después, este cultivo se centrifugó (Centrifuga Beckman J2-21) a 1090 g durante 10 minutos; el sobrenadante se descartó, y el pellet fue resuspendido en agua (mismo volumen al del cultivo). Por último, la solución con la bacteria se pipeteó directamente en el sustrato cerca de las plántulas. Cada plántula fue inoculada con 1 mL de solución bacteriana.

La inoculación se realizó cuando las plántulas cumplieron siete días de haber sido trasplantadas a macetas.

La mitad de las macetas preparadas fueron inoculadas con solución bacteriana, y el resto no se inocularon (control negativo). Las plántulas permanecieron en el cuarto de cultivo durante 7 días; después de ese tiempo las raíces fueron colectadas.

6. 2. 4. Extracción de ARN de raíces de *Lotus japonicus*

Las raíces de tres réplicas biológicas fueron colectadas por separado, pulverizadas y congeladas con nitrógeno líquido. Para la extracción de ARN se utilizó el kit de Norgen Biotek Corp., Plant/Fungi Total RNA Purification®; y se siguieron las instrucciones propuestas en el kit.

La calidad del ARN extraído se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa; antes de cargar, las muestras fueron calentadas durante 5 minutos a 65° C, posteriormente fueron cargados 5µL de cada muestra de ARN, y se dejaron migrar por 30 minutos aproximadamente.

También se realizó una medición con ayuda de un nano-espectrofotómetro (NanoDrop) para conocer la concentración exacta y la pureza del ARN obtenido durante la extracción. El tratamiento con DNasa se realizó con la DNase I, RNase-free® de Thermo Scientific.

6. 2. 5. Síntesis de ADNc

El proceso de síntesis de ADNc se realizó con ayuda del kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis® de Thermo Scientific; y se siguió el protocolo propuesto en dicho kit, con 1 µg de ARN total.

6. 2. 6. RT-qPCR

Las reacciones para RT-qPCR fueron preparadas con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR, Master Mix (2X)® de Thermo Scientific; siguiendo el protocolo propuesto en el kit; los ensayos se realizaron con el equipo de PCR en tiempo real de 96 pozos StepOne™ de

Applied Biosystems® y se utilizó el software StepOne™ para configurar, ejecutar y analizar los experimentos realizados. Fueron requeridas placas de 96 pozos de Applied Biosystems® compatibles con el equipo de PCR en tiempo real.

Para las reacciones de RT-qPCR se utilizaron los genes normalizadores descritos en el artículo de Tirichine y colaboradores de 2007; *PP2A* (Proteína fosfatasa 2), *TB2C* (Tubulina cadena β) y *ATP* (ATP sintasa); y los oligonucleótidos específicos para cada uno de los *ROP*; los cuales fueron diseñados y probados con anterioridad por nuestro grupo de investigación.

Para cada par de oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR se realizó una curva estándar; los valores obtenidos fueron empleados para ajustar la eficiencia de cada una de las reacciones realizadas. Para el análisis estadístico de los datos se realizó una prueba de “*t*” considerando un valor significativo para “*p*” de ≤ 0.05 .

Las reacciones de RT-qPCR fueron realizadas en tres réplicas técnicas para el gen *ROP3*, así como para los genes de referencia; además se incluyó un control negativo sin templado para cada gen y el control sin enzima retrotranscriptasa (-RT) generado durante la síntesis de ADNc.

6. 3. Análisis y comparación de los perfiles de expresión de los genes *ROP*

6. 3. 1. Determinación del número de genes *ROP* para cada especie de leguminosa analizada

La determinación del número de genes *ROP* para cada especie de leguminosa se realizó en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y en LIS-Legume Information System (<https://legumeinfo.org/>); por medio de un BLASTp en el que se compararon las secuencias proteicas de los *LjROP* contra cada una de las leguminosas analizadas, *Arachis hypogaea*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*.

Para el BLASTp fueron utilizados los parámetros que por defecto sugieren las plataformas en línea; posteriormente para realizar el filtro de las secuencias consideramos un valor de identidad del 80%.

Obtenidas las secuencias proteicas se prosiguió a identificar los dominios conservados en las proteínas ROP, esto se realizó en la base de datos de dominios conservados de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), y posteriormente fueron verificados en SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

6. 3. 2. Análisis filogenético de las secuencias proteicas de la familia ROP en leguminosas

Posteriormente, se prosiguió a realizar un análisis filogenético de las secuencias proteicas de la familia ROP en *Lotus japonicus*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* y *Phaseolus vulgaris*, mediante la realización de un árbol utilizando el método de “neighbor-joining” y ajustando el valor de iteraciones para Bootstrap en 1000. El árbol fue generado en MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

6. 3. 3. Consulta de los perfiles de expresión en bases de datos

A continuación, se consultaron los perfiles de expresión de los *ROP* en las siguientes bases de datos *A. hypogaea* – LegumeIP V3 (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIP/gdp/>), *M. truncatula* – MtrunA17r5.0-ANR (<https://medicago.toulouse.inra.fr/Mtrun17r5.0-ANR/>) y LegumeIP V3, *P. vulgaris* – PvGEA (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/index.jsp#>), *G. max* – Phytozome: InterMine (<https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do>) y *L. japonicus* – Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>).

Una vez que se obtuvieron los datos, se prosiguió a realizar una normalización de estos; para cada uno de los tiempos y/o condición evaluados fue seleccionado el valor de expresión más alto, al cual le asignamos un valor de 100, posteriormente mediante un cálculo matemático de regla de tres asignamos valores en la escala del 1 al 100 al resto de los genes de ese tiempo

y/o condición evaluados. Realizado lo anterior proseguimos a la elaboración del esquema estilo “heat map”.

6. 4. Análisis de la actividad de los promotores de los genes *LjROP* *in vivo* en raíces transformadas de *Lotus japonicus*

6. 4. 1. Análisis bioinformático de las secuencias promotoras de los genes *LjROP*

Las secuencias promotoras de los *LjROP* con una longitud aproximada de 2 kilobases, fueron sometidas a un análisis bioinformático en la plataforma de New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) con la finalidad de conocer los sitios de unión a factores de transcripción relacionados con la simbiosis, presentes en éstas.

6. 4. 2. Construcción del plásmido binario pC GW mCherry 3x Venus

La realización del mapa espacio - temporal de la expresión de los *ROP* se llevó a cabo mediante la transformación (generación de hairy roots) de plantas de *Lotus japonicus* ecotipo MG20; para esto se comenzó con la construcción de un vector, el cual se basó en el plásmido binario pC GW mCherry (Dalal *et al.*, 2015) 3xVenus (Vermeer *et al.*, 2014), disponible en el laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes; y fue elegida la selección por fluorescencia (mCherry proteína roja fluorescente) para esta construcción.

En total se construyeron nueve plásmidos, que cuentan con una fusión transcripcional de un trímero de *Venus* cuya expresión está dirigida por el promotor endógeno de cada uno de los genes *ROP*.

Las secuencias promotoras de los nueve genes *ROP* ya se encontraban amplificadas y subclonadas en plásmidos pMiniT (*Ver Anexo III*); los cuales fueron utilizados como templado para la amplificación de las secuencias promotoras de interés mediante oligonucleótidos (*Ver Anexo VIII*) que adicionaron un sitio de corte para Sall (oligo forward) y EcoRI (oligo reverse).

Tener las secuencias promotoras subclonadas en estos plásmidos también permitió realizar una mutagénesis dirigida en dos de las secuencias promotoras donde estaba localizado un sitio de corte para EcoRI y que imposibilitaba la tarea de clonar la secuencia promotora completa en el plásmido binario (pC GW mCherry 3xVenus).

Posteriormente, las secuencias promotoras amplificadas y purificadas y el pC GW mCherry 3xVenus fueron digeridos con SalI y EcoRI; y se realizó la ligación del promotor con el plásmido, transformando finalmente el producto de esta ligación en *E. coli* TOP10 (Ver Anexo IV).

Después se prosiguió a realizar la transformación de *Agrobacterium rhizogenes* AR10 (Ver Anexo VI) con los vectores construidos, una vez concluido lo anterior se continuó con la infección de las plantas para generar raíces transformadas.

6. 4. 3. Construcción del plásmido binario pC GW mCherry GUS

Para realizar el ensamblaje de esta construcción se partió del plásmido pC GW mCherry 3x Venus, el cual fue digerido con XbaI y AatII para retirar el trímero de *Venus* y sustituirlo por el gen *GUS*.

A la par de esto fueron diseñados oligonucleótidos (Ver Anexo IX) para añadir estos sitios de corte a la secuencia del gen *GUS*.

A continuación, el inserto (gen *GUS*) y el vector (plásmido pC GW mCherry 3x Venus) fueron digeridos con ambas enzimas de restricción; los productos de la reacción fueron purificados y posteriormente ligados.

6. 4. 4. Protocolo para generación de “hairy roots”

El protocolo utilizado por nuestro grupo de investigación es una versión adaptada de Díaz y colaboradores (2005).

De cuatro a cinco días antes de comenzar con la generación de hairy roots, se germinaron 40 semillas por construcción y se dividieron en dos placas con ½X B5 (pH 5.6, 1.2% de Phytoagar o agarosa), las cajas fueron selladas con parafilm y se incubaron en la oscuridad durante cuatro a cinco días.

Dos días previos a realizar la transformación de las plantas, se realizó una resiembra en el medio de selección adecuado (medio LB-Rifampicina-Kanamicina) de cada una de las construcciones que con anterioridad fueron transformadas en *Agrobacterium rhizogenes*.

6. 4. 5. Transformación de plantas

Como primer paso se descartaron las plántulas que presentaban un defecto en su crecimiento y las semillas que no germinaron.

Posteriormente con una aguja estéril, se tomó una muestra de bacteria, y se pinchó cuidadosamente el hipocótilo de las plántulas, esto se realizó alrededor de cinco veces; fue necesario penetrar hasta la zona del córtex, pero sin alcanzar el centro de la vasculatura.

Se esparció el resto de la bacteria adherida a la aguja en las zonas pinchadas del hipocótilo., al terminar esto las cajas se sellaron y fueron regresadas a la oscuridad.

Un día después de la transformación las cajas fueron transferidas a la luz; permanecieron de una a dos semanas en el cuarto de cultivo. Después de este tiempo fue posible observar el crecimiento de hairy roots en las zonas del hipocótilo que fueron pinchadas.

6. 4. 6. Transferencia de plántulas a sustrato

Aproximadamente 14 días después de la transformación, se realizó el corte de las hairy roots no transformadas (todas aquellas raíces que no expresaban la proteína mCherry - rojo fluorescente); después fueron transferidas a vermiculita y regadas con solución B&D, las macetas fueron cubiertas con una bolsa plástica durante una semana para permitir la aclimatación de las plántulas, durante esta semana la bolsa fue abierta de manera gradual.

Las plantas se dejaron crecer durante una o dos semanas para permitir la proliferación de las “hairy roots”. Concluido este tiempo fue posible realizar la inoculación con la bacteria simbiótica *M. loti*.

6. 4. 7. Evaluación de la actividad de los promotores

Ulteriormente, mediante microscopia, se realizó una selección minuciosa de las raíces transformadas, mediante la observación de la fluorescencia roja (mCherry-Ex λ 587 nm, Em λ 610 nm) en las mismas, aquellas que no la presentaban fueron separadas de la planta. En seguida, con un microscopio confocal (modelo Olympus FV100 Multi-fotónico Upright BX61WI), fue detectada la fluorescencia amarilla (Venus-Ex λ 515 nm, Em λ 528 nm), indicando el sitio de actividad de los promotores evaluados. Dichos ensayos fueron realizados antes y después de la inoculación con la bacteria simbiótica *M. loti*.

Los ensayos histoquímicos con *GUS* se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por Kirsten Bomblies en 2007 (*Ver Anexo X*). Las imágenes fueron capturadas con el Microscopio Zeiss AxioSkop 2 Upright SKU 007.

7. Resultados y discusión

7. 1. Comparación de la acumulación de transcritos de los genes *ROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre

El primer objetivo de este trabajo de investigación consistió en comparar la acumulación de transcritos de los genes *ROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre, esto se realizó mediante RT-qPCR.

El perfil de expresión de *ROP3* se determinó en las raíces después de siete días de haberse realizado la inoculación con *M. loti* cepa MAFF 303099 (Expresando el gen *LacZ*) (Figura 5). La acumulación del transcrito de *ROP3* en el fondo mutante *rop3* disminuyó drásticamente en comparación con el fondo silvestre. Estos resultados ayudan a sustentar el argumento de que la disminución de transcritos del gen *ROP3* en su fondo mutante causó un descenso significativo en el número de eventos de nodulación, además de una diferencia notable en el promedio de hilos de infección comparado con las plantas silvestres (Castro, 2019).

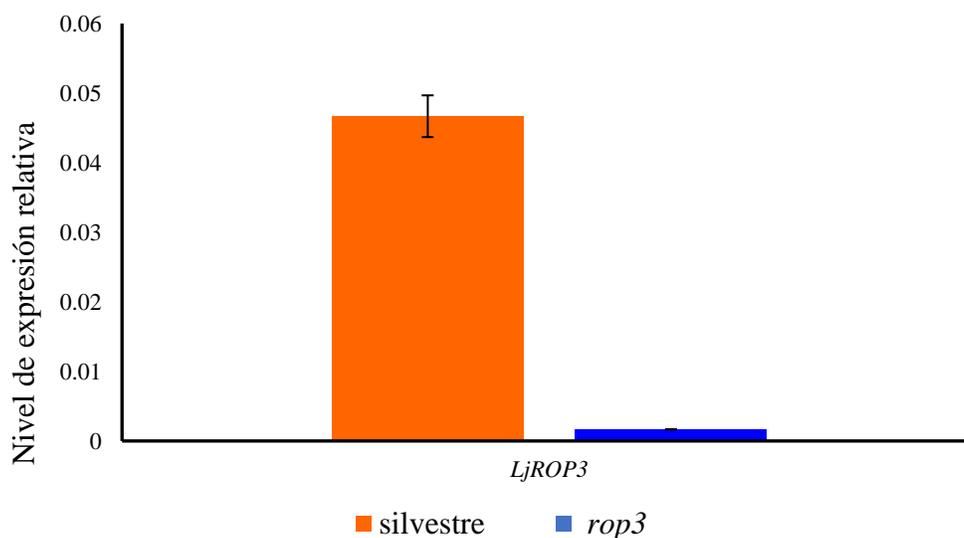


Figura 5. Perfil de expresión de *LjROP3* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre. El nivel relativo de expresión del gen fue cuantificado en raíces de *Lotus japonicus* siete días después de haber realizado la inoculación con la cepa MAFF 303099 (*LacZ*) de *M. loti*. Los niveles de expresión fueron normalizados con los genes *PP2A*, *TB2C* y *ATP*. Las barras de error representan el promedio de la desviación estándar de las mediciones realizadas en tres réplicas biológicas independientes. Los valores fueron ajustados de acuerdo con la eficiencia obtenida en la curva estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó con una prueba de “t” considerando un valor significativo de $p \leq 0.05$.

Posteriormente se prosiguió a realizar la comparación de la acumulación de transcritos del resto de los genes *LjROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre; esto con la finalidad de determinar si la disminución del transcrito de *ROP3* generaría un efecto en la acumulación del resto de los genes *ROP*. De manera similar al ensayo anterior el perfil de expresión de los *LjROP* se determinó en las raíces después de siete días de haberse inoculado con *M. loti* (Figura 6). Los niveles de acumulación de transcrito para *LjROP1* y *LjROP6* se duplicaron en el fondo mutante *rop3* en comparación al fondo silvestre, mientras que para el resto de los genes *LjROP* (a excepción de *LjROP9*) los niveles de acumulación de transcrito en el fondo mutante aumentaron.

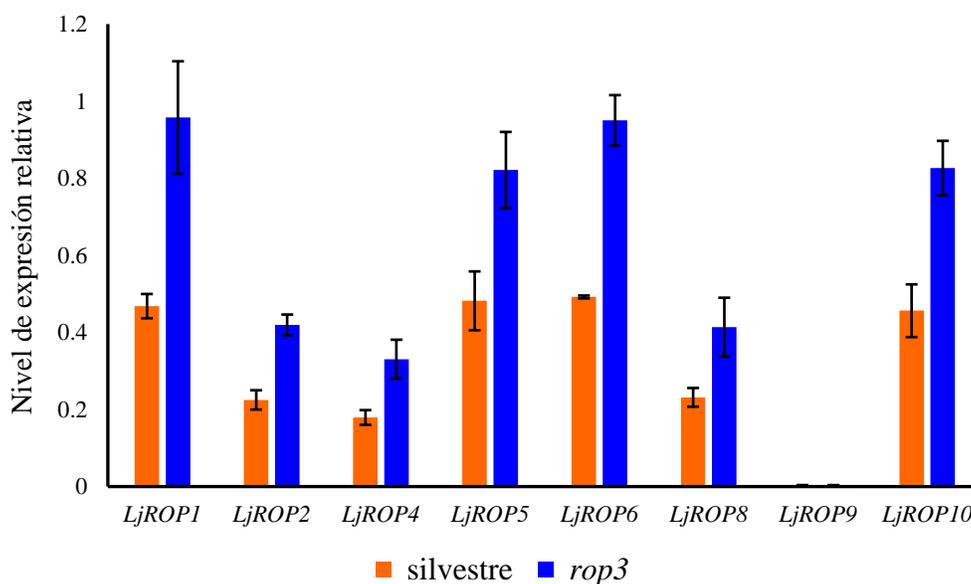


Figura 6. Perfiles de expresión de los *LjROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre. Los niveles relativos de expresión de los genes fueron cuantificados en raíces de *Lotus japonicus* siete días después de haber realizado la inoculación con la cepa MAFF 303099 (*LacZ*) de *M. loti*. Los niveles de expresión fueron normalizados con los genes *PP2A*, *TB2C* y *ATP*. Las barras de error representan el promedio de la desviación estándar de las mediciones realizadas en tres réplicas biológicas independientes. Los valores fueron ajustados de acuerdo con la eficiencia obtenida en la curva estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó con una prueba de “t” considerando un valor significativo de $p \leq 0.05$ encontrando una expresión diferencial significativa para todos los genes a excepción de *LjROP9*.

Si consideramos que la familia de genes *ROP* es altamente conservada, estos resultados podrían sugerir la existencia de redundancia funcional dentro de los miembros de esta familia. Al disminuir la acumulación de transcritos de *ROP3* en el fondo mutante, hubo un aumento en la acumulación de transcritos del resto de los miembros de la familia, tal vez con

la finalidad de compensar la función de *ROP3* y probablemente a través de un bucle de retrocontrol. Podemos suponer que, en una planta silvestre, la expresión de *ROP3* inhibe la expresión de los otros miembros de la familia.

7. 2. Análisis y comparación de los perfiles de expresión de los genes *ROP*

El segundo objetivo del trabajo de investigación consistió en comparar los datos de acumulación de transcritos publicados de los *ROP* con los datos de RT-qPCR que se obtuvieron con anterioridad en nuestro grupo de investigación, esto con la finalidad de enriquecer y afinar los perfiles de expresión de los *ROP*.

Durante mi tesis de licenciatura evalué los perfiles de expresión de los genes *ROP* en raíces de *Lotus japonicus* antes y después de la inoculación con *Mesorhizobium loti*, observando que en las condiciones evaluadas (tres y siete días después de la inoculación) *LjROP2* y *LjROP9* podrían no estar involucrados en las etapas tempranas de la simbiosis, mientras que *LjROP6* y *LjROP1* figuraban como candidatos potenciales para desempeñar un rol en el proceso de simbiosis (Cruz, 2018).

Los datos anteriores se obtuvieron de la raíz, la cual es un órgano formado por la asociación de diversos tipos de células, incluyendo el pelo radical. En comparación con el resto de la raíz, el pelo radical representa una proporción de células muy baja, por lo que, si ocurriera una inducción génica a nivel del pelo radical ésta podría ser opacada por el resto de la raíz, en especial bajo este tipo de enfoques donde se estudia la raíz en su totalidad. Para solucionar este dilema se comenzó a trabajar en la estandarización de una técnica para el aislamiento de pelos radicales, y de esta manera poder afinar los perfiles de expresión de los *ROP*. Desafortunadamente no se logró el aislar pelos radicales.

Por consiguiente, se decidió trabajar con los datos de transcriptómica que Kelly y colaboradores publicaron en 2018, y verificar la expresión de los genes *ROP* en múltiples tejidos, por ejemplo, pelos radicales y primordios de nódulos. Esta información se encuentra disponible en la base de datos Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>). Una vez que se obtuvieron

los datos, y con la finalidad de simplificar el análisis de estos, se elaboró un esquema estilo “*heat map*”; para esto se realizó la normalización de los datos para posteriormente poder representarlos en un gradiente de color.

En el esquema estilo “*heat map*” se representan los resultados obtenidos en mi tesis de licenciatura para raíz, los datos de transcriptómica de Kelly y colaboradores para raíz, pelos radicales y primordios de nódulos, y por último los datos de expresión publicados por Ke y colaboradores (2016) para raíz y nódulos (*Figura 7*).

Al analizar los datos correspondientes a Kelly y colaboradores (*Figura 7*) prestamos especial interés en los pelos radicales y los nódulos, ya que estos tejidos están estrechamente ligados con la simbiosis y no contábamos con datos previos de estos. Observamos que *LjROP5* presenta mayor expresión en pelos radicales, teniendo su punto más alto un día después de la inoculación con la bacteria simbiótica; en contraste con *LjROP4* y *LjROP8* que prácticamente no se encuentran expresados en pelos radicales bajo estas condiciones.

Para el caso particular de los primordios de nódulos, a siete días después de la inoculación con la bacteria simbiótica, *LjROP3*, *LjROP5* y *LjROP6* son los genes más expresados.

Los datos de raíz mostraron que a tres días después de la inoculación con la bacteria simbiótica, *LjROP3*, *LjROP5*, *LjROP6* y *LjROP10* tienen los valores más altos de expresión en comparación con el resto de los genes ROP. Es importante señalar que los resultados reportados por Kelly y colaboradores para *LjROP6* son muy similares a los datos obtenidos durante mi tesis de licenciatura (*Figura 7*).

En 2012, Ke y colaboradores publicaron un trabajo donde evaluaron el perfil de expresión de *LjROP6* en *Lotus japonicus* durante las etapas tempranas de la simbiosis; por lo que dentro de este análisis comparativo también se incluyeron los resultados publicados por estos autores.

Ellos evaluaron el perfil de expresión de *LjROP6* en raíces durante las primeras etapas de la simbiosis, y observaron que *LjROP6* tiene un punto máximo de expresión a dos días después de la inoculación con la bacteria simbiótica *Mesorhizobium loti* en comparación con el control no inoculado.

Al no coincidir estos resultados con los obtenidos por Kelly y colaboradores y por nuestro grupo de investigación, se realizó la búsqueda del número de acceso de la secuencia de *LjROP6* en el artículo de Ke, con la finalidad de descartar un posible error de nomenclatura en los genes publicados en este artículo que nos pudieran llevar a realizar una comparación errónea entre genes.

Sin embargo, el número de acceso publicado por Ke y colaboradores (*LjROP6* – No. de acceso: JF260911) es diferente al utilizado por nuestro grupo de investigación (*LjROP6* – No. de acceso: Lj0g3v0167719) y proviene de una librería de ADNc de *Lotus*; por lo cual se prosiguió a realizar una comparación de un fragmento de secuencia de *LjROP6* publicada en dicho artículo contra las secuencias de los *ROP* que se utilizan en nuestro grupo, encontrando que no correspondía a *LjROP6*.

Posteriormente, en 2016, Ke y colaboradores publicaron otro artículo donde evaluaron la expresión de todos los genes *ROP* en *L. japonicus* durante la simbiosis, obteniendo un perfil de expresión distinto a los datos obtenidos por nuestro grupo de investigación (*Figura 7*); e incluso, dichos datos difieren de lo reportado por Kelly y colaboradores en 2018.

Por lo cual, en su momento se prosiguió a realizar un análisis de la publicación con la finalidad de encontrar una explicación a las diferencias encontradas entre los datos de nuestro grupo y lo publicado por Ke y colaboradores tanto en 2012 como en 2016.

El primer punto que sobresalió fue que en dicha publicación (Ke *et al.*, 2016) existen variaciones en la nomenclatura propuesta para los *LjROP*, debido a que algunos de los números de acceso para las secuencias de los *LjROP* citadas en el artículo corresponden a un gen *ROP* diferente en las bases de datos, como Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>) o Miyakogusa (<https://www.kazusa.or.jp/lotus/index.html>), solo por mencionar algunos ejemplos.

A continuación, se anexa una tabla (**Tabla 2**) donde se puede ejemplificar de manera más clara las diferencias de nomenclatura en los genes *LjROP*.

Tabla 2

Comparación en la nomenclatura de los genes *LjROP*

Nombre del gen (Ke <i>et al.</i> , 2016)	Gene (Base de datos)
<i>LjROP1</i>	<i>LjROP1</i>
<i>LjROP2</i>	<i>LjROP2</i>
<i>LjROP4</i>	<i>LjROP4</i>
<i>LjROP5</i>	<i>LjROP6</i>
<i>LjROP6</i>	<i>LjROP3</i>
<i>LjROP7</i>	<i>LjROP5</i>
<i>LjROP8</i>	<i>LjROP8</i>
<i>LjROP9</i>	<i>LjROP9</i>
<i>LjROP10</i>	<i>LjROP10</i>

Una vez que se determinó a que genes correspondían realmente los números de acceso citados por Ke y colaboradores (2016), comparamos el número de acceso para el gen *LjROP6* en el artículo de Ke del 2012 (No. de acceso: JF260911) con el número de acceso citado en el artículo de 2016 (No. de acceso: ADY16660.1) y ambos números no coincidieron, sumado a esto el gen nombrado como *LjROP6* en la publicación de 2012, corresponde realmente al gen *LjROP5* de la publicación de 2016. El no respetar la nomenclatura asignada y no mantener una continuidad en los nombres y números de acceso de cada gen entre publicaciones nos generó incertidumbre sobre la veracidad de estos resultados, por lo tanto verificar y ordenar estos resultó necesario y nos permitió no derivar en una interpretación incorrecta.

Una vez identificados los errores en la nomenclatura de los genes *LjROP* en ambos artículos se prosiguió a comparar el perfil de expresión del mismo gen llamado *LjROP5* en la publicación de 2012 y *LjROP6* en 2016, encontrando que no hay coincidencias entre ambos. En el artículo de 2012, *LjROP5* tiene un nivel máximo de expresión a los dos días tras la inoculación con *M. loti*, mientras que en la publicación de 2016 dicho gen presenta un pico máximo de expresión a siete días después de la inoculación, resultado que no coincide con lo que había sido reportado para 2012.

Por otra parte, considerando que la familia de genes *ROP* es altamente conservada; se llevó a cabo el análisis bioinformático de los oligonucleótidos para PCR tiempo real que utilizaron Ke y colaboradores (2016), con la finalidad de conocer la especificidad de estos. Los oligos se compararon mediante un alineamiento contra todas las secuencias de los *LjROP* para asegurarse que solo amplificarán la secuencia de un único miembro de la familia *ROP*; tras este análisis se encontró que varios de los oligos propuestos por Ke y colaboradores se encuentran en zonas conservadas y podrían llegar a amplificar hasta tres miembros de la familia, lo que ocasionaría un error en la eficiencia de la reacción de PCR tiempo real, que a su vez podría derivar, en una interpretación errónea de los resultados.

Este tipo de problema puede llegar a ser muy común al momento de realizar ensayos de PCR tiempo real, por lo que, en nuestro grupo de investigación, diseñamos los oligos para que uno de estos se uniera a una secuencia en la región 3'-UTR, zona que se caracteriza por tener mayor variabilidad, lo que disminuye el riesgo de amplificar más de un gen *ROP*. Además, los productos amplificados por los oligos para PCR tiempo real se secuenciaron, descartando así la posibilidad de amplificar más de un gen *ROP* a la vez.

Otro punto por destacar es que en gran parte de la literatura consultada sobre la técnica de PCR en tiempo real, se menciona que es importante utilizar por lo menos dos o tres genes normalizadores en este tipo de ensayo. Dichos genes tienen la característica de mantener un nivel de expresión constante incluso en diferentes estados fisiológicos de la célula o en respuesta a los tratamientos evaluados. Ke y colaboradores (2012 y 2016) mencionan que sus resultados fueron normalizados y comparados con la expresión del gen de “poliubiquitina”; al utilizar un

solo gen es imposible saber si éste mantiene una expresión constante y por lo tanto el análisis e interpretación global de los resultados de PCR tiempo real podría llegar a ser erróneo.

A manera de conclusión, el análisis que realizamos del perfil de expresión de los *ROP* en *Lotus japonicus*, nos permitió darnos cuenta de la gran variabilidad que puede llegar a existir entre un ensayo u otro; en la mayoría de los casos estas variaciones en los parámetros evaluados no pueden ser controladas por el experimentador, pero si nos permiten crear una visión general del comportamiento de los genes de interés.

De igual forma es preciso señalar que los resultados obtenidos en mi tesis de licenciatura se asemejan más a lo reportado por Kelly y colaboradores, al no haber una inducción significativa de los *LjROP* tras realizar la inoculación con la bacteria simbiótica *M. loti*; contrario a los datos que presentan Ke y colaboradores, donde algunos de los genes *LjROP* son inducidos tras la inoculación (*Figura 7*).

Gracias a este análisis también fue posible realizar una preselección de los genes *LjROP* que podrían desempeñar un papel en la simbiosis, siendo los principales candidatos *LjROP1*, *LjROP3*, *LjROP5*, *LjROP6* y *LjROP10*, y en los que nos enfocamos un poco más al momento de desarrollar y analizar los experimentos que se discutirán en las secciones siguientes.

7. 2. 1. Perfil de expresión de los genes *ROP* en otras leguminosas

Como se mencionó en la sección anterior, uno de los objetivos del presente trabajo de investigación es el de consultar y comparar el perfil de expresión de los genes *ROP* en *Lotus japonicus*; pero con la finalidad de enriquecer los resultados y alcances de dicho objetivo nos dimos a la tarea de ampliar la búsqueda del perfil de expresión de los *ROP* en otras especies de leguminosas como *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* y *Arachis hypogaea*.

Para cumplir con este objetivo se comenzó con la determinación del número de genes *ROP* para cada especie vegetal. Esto se realizó en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y en LIS-Legume Information System

(<https://legumeinfo.org/>); por medio de un BLASTp en el que se compararon las secuencias proteicas de los *LjROP* contra cada una de las especies vegetales mencionadas, seguido de esto se descargaron aquellas secuencias que tenían los valores más altos de “Identidad” (>80%), se generó un listado con todas las secuencias, después guiándonos por el número de acceso se verificó que no estuvieran repetidas o fueran isoformas; por último se prosiguió con la búsqueda de los dominios conservados para las proteínas ROP en las secuencias previamente identificadas.

En el caso de *M. truncatula* la selección de las secuencias fue aún más sencilla porque las proteínas ROP ya fueron descritas con anterioridad y se encuentran anotadas en bases de datos como MtrunA17r5.0-ANR (<https://medicago.toulouse.inra.fr/Mtrun17r5.0-ANR/>) y LegumeIP V3 (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIP/gdp/>).

Se identificaron 12 secuencias de genes *ROP* para *A. hypogaea*, 21 para *G. max*, 11 para *P. vulgaris* y 7 para *M. truncatula*. En el apartado de *Anexos / Anexo XI* pueden consultarse las tablas con los números de acceso para cada una de las secuencias encontradas. Una vez que contamos con los números de acceso y las secuencias proteicas para cada gen, se generó un árbol filogenético (*Figura 8*) que nos permitió conocer la agrupación de los genes *ROP* de *Lotus japonicus* con el resto de las leguminosas.

En el árbol filogenético generado, las proteínas ROP fueron agrupadas en seis grupos, en los cuáles se encuentra por lo menos una proteína ROP perteneciente a *Lotus japonicus*; a excepción de los grupos que congregan a dos proteínas como es el caso de LjROP2 y LjROP4, LjROP1 y LjROP5, así como LjROP3 y LjROP6 (*Figura 8*).

Gracias a la información proporcionada por el árbol fue posible elaborar una tabla (**Tabla 3**) de equivalencias entre los *ROP* de *Lotus* y el resto de las leguminosas; cabe destacar que esta tabla fue de mucha utilidad porque nos permitió analizar y comparar de manera más organizada y rápida los perfiles de expresión de los *ROP* en el resto de las leguminosas consultadas.

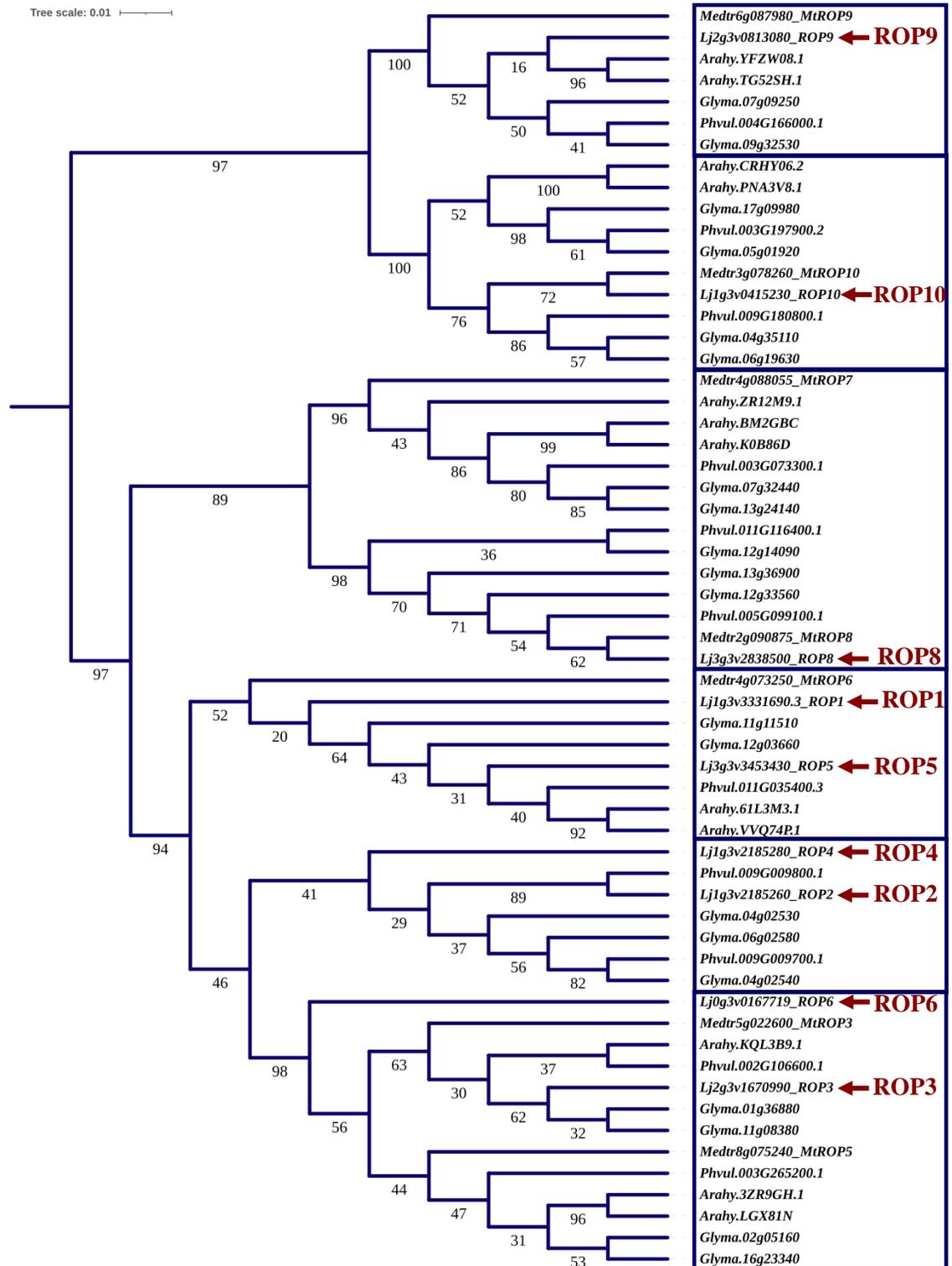


Figura 8. Árbol filogenético de ROP basado en el análisis de las secuencias proteicas disponibles de la familia ROP en *Lotus japonicus*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* y *Phaseolus vulgaris*. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de “neighbor-joining”. Los valores de Bootstrap presentes en cada ramificación se obtuvieron después de 1000 iteraciones. Los grupos formados en el árbol son señalados con recuadros azules, y con una flecha roja se señala el gen *LjROP* presente en cada agrupación. (Árbol generado en MAFFT versión 7, disponible en <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Tabla 3Relación de equivalencia entre los genes ROP de *Lotus* y los genes de las otras leguminosas

<i>Lotus japonicus</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>LjROP2</i>	-	<i>Glyma.04g02530</i>	-	<i>Phvul.009G009800.1</i>
<i>LjROP4</i>	-	<i>Glyma.04g02540</i> <i>Glyma.06g02580</i>	-	<i>Phvul.009G009700.1</i>
<i>LjROP3</i>	<i>Arahy.KQL3B9.1</i>	<i>Glyma.01g36880</i> <i>Glyma.11g08380</i>	<i>MtROP3</i>	<i>Phvul.002G106600.1</i>
<i>LjROP6</i>	<i>Arahy.LGX81N</i> <i>Arahy.3ZR9GH.1</i>	<i>Glyma.02g05160</i> <i>Glyma.16g23340</i>	<i>MtROP5</i>	<i>Phvul.003G265200.1</i>
<i>LjROP5</i>	<i>Arahy.VVQ74P.1</i>	<i>Glyma.12g03660</i>	<i>MtROP6</i>	<i>Phvul.011G035400.3</i>
<i>LjROP1</i>	<i>Arahy.61L3M3.1</i>	<i>Glyma.11g11510</i>		
<i>LjROP8</i>	<i>Arahy.BM2GBC</i>	<i>Glyma.13g24140</i>	<i>MtROP7</i>	<i>Phvul.011G116400.1</i>
	<i>Arahy.K0B86D</i>	<i>Glyma.07g32440</i> <i>Glyma.12g14090</i>	<i>MtROP8</i>	<i>Phvul.005G099100.1</i>
	<i>Arahy.ZR12M9.1</i>	<i>Glyma.12g33560</i> <i>Glyma.13g36900</i>		<i>Phvul.003G073300.1</i>
<i>LjROP9</i>	<i>Arahy.YFZW08.1</i> <i>Arahy.TG52SH.1</i>	<i>Glyma.09g32530</i> <i>Glyma.07g09250</i>	<i>MtROP9</i>	<i>Phvul.004G166000.1</i>
<i>LjROP10</i>	<i>Arahy.CRHY06.2</i>	<i>Glyma04g35110</i>	<i>MtROP10</i>	<i>Phvul.009G180800</i>
	<i>Arahy.PNA3V8.1</i>	<i>Glyma.06g19630</i> <i>Glyma.05g01920</i>		<i>Phvul.003G197900.2</i>
		<i>Glyma.17g09980</i>		

Con la finalidad de que los datos obtenidos pudieran compararse con la información publicada para *Lotus japonicus*, se consideraron dos criterios: que los datos de expresión provinieran de RNAseq (preferiblemente) y que los tiempos y condiciones evaluadas fueran lo más cercanos posible a los ensayos que realizamos en *L. japonicus* (tres y siete días después de la inoculación con *M. loti*).

Una vez que obtuvimos los datos de expresión para cada una de las leguminosas y con el propósito de simplificar el análisis de estos resultados, se elaboraron tres esquemas estilo “heat

map”, en los cuales el color blanco representa el valor más bajo de expresión y la tonalidad azul oscuro el más alto (*Figuras 9, 10 y 11*).

Los “*heat maps*” fueron organizados de la siguiente manera, en el primer esquema (*Figura 9*) se agruparon todos los datos de expresión de raíz; el segundo esquema agrupa la información encontrada sobre pelos radicales (*Figura 10*), y el tercero muestra la información recabada sobre nódulos (*Figura 11*).

Comenzaremos con el análisis de la *Figura 9*, en la que podemos destacar que los genes *ROP3*, *ROP5*, *ROP6* y *ROP10* en *Lotus japonicus* mantienen un perfil de expresión más elevado en comparación con el resto de los *ROPs*; para el caso de *ROP3*, *ROP5* y *ROP6*, esta tendencia se conserva en el resto de las leguminosas analizadas, ya sea en condición control o tras la inoculación con su respectivo simbionte; lo que podría indicar que dichos genes mantienen una respuesta similar en las leguminosas evaluadas.

Tener expresión de estos genes en la raíz podría ser un indicio de su participación en la simbiosis, por lo que resultó de gran importancia verificar su perfil de expresión en pelos radicales y nódulos, tejidos que se encuentran estrechamente ligados con el proceso de simbiosis.

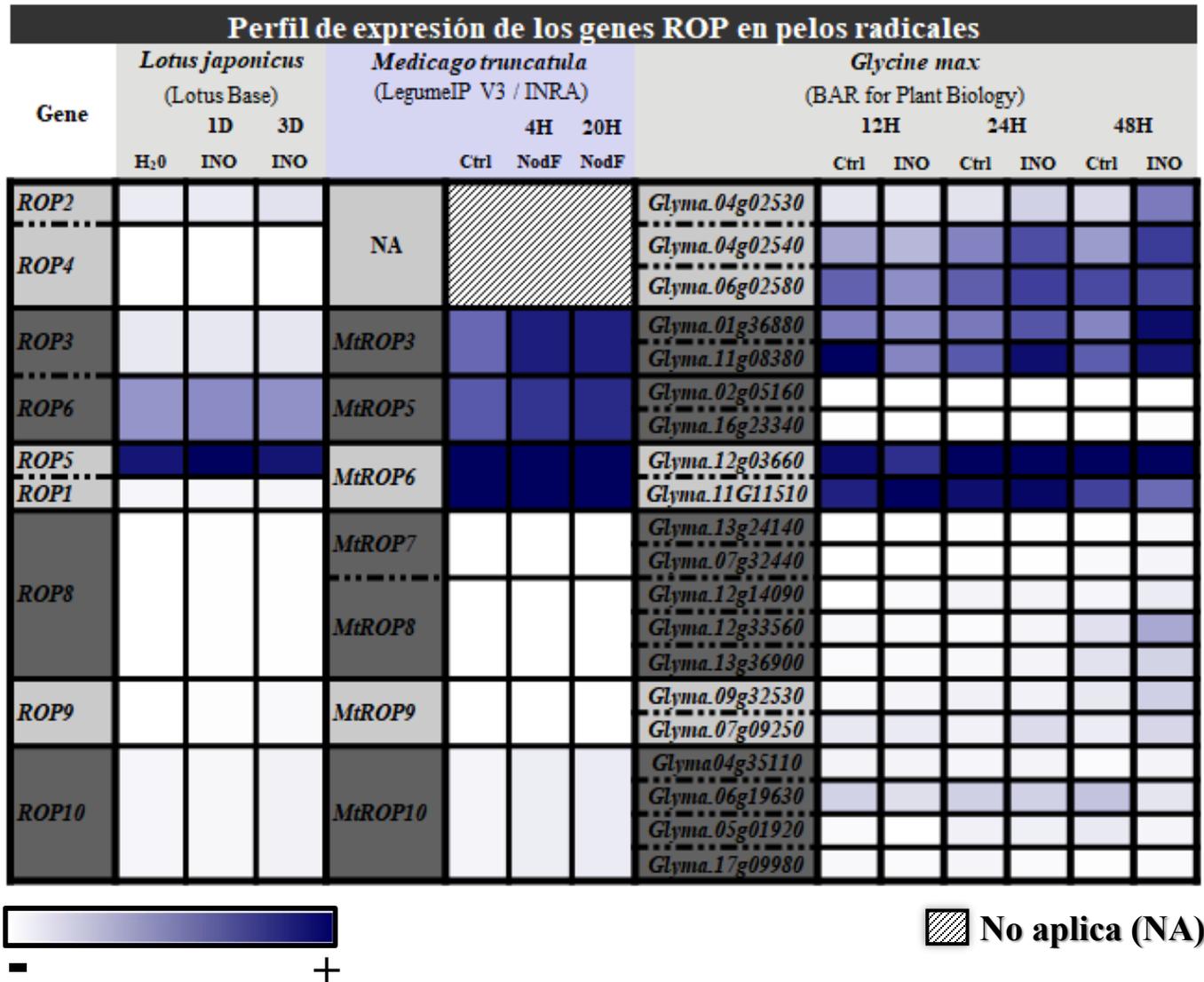


Figura 10. Esquema estilo “heat map” donde se representan los perfiles de expresión de los genes ROP en pelos radicales de *L. japonicus*, *M. truncatula* y *G. max*. El color blanco indica el valor más bajo de expresión, en contraste la tonalidad azul oscuro representa el valor más alto.

Abreviaciones utilizadas en la figura: Ctrl: Control, INO: Inoculado, NodF: Nod Factor / Factor Nod, D: Días y H: Horas

En la Figura 10 se representan los perfiles de expresión en pelos radicales para tres especies de leguminosas *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* y *Glycine max*; realizar este esquema fue de gran ayuda, porque si recordamos lo que se mencionó con anterioridad para el caso de nuestra leguminosa de estudio *L. japonicus*, no logramos estandarizar una técnica que nos permitiera aislar pelos radicales, por lo que recurrimos a la información contenida en las bases de datos para conocer el perfil de expresión de los ROP en varias especies de leguminosas.

En caso de que nosotros como grupo de investigación hubiéramos limitado nuestra búsqueda a *Lotus* solo contaríamos con datos de expresión en pelos radicales de tres y siete días; si bien los datos recabados de estos tiempos son importantes, no reflejan ni nos permiten conocer lo que ocurre en las primeras horas tras la inoculación con la bacteria simbiótica (etapa temprana), de ahí la importancia de haber incluido el perfil de expresión de *Medicago* y de *Glycine*, leguminosas donde evaluaron tiempos más tempranos y que nos permitieron crear una idea del perfil de expresión de los *ROP* en *Lotus* durante las primeras horas tras la inoculación con la bacteria simbiótica.

Los genes *ROP5* y *ROP6* que se encontraban expresados en raíz de manera considerable, también presentan una expresión alta en pelos radicales tanto en *Lotus* como en *Medicago*; estos datos son interesantes y en base a ellos podríamos hipotetizar que *ROP5* y *ROP6* podrían desempeñar un papel en las etapas tempranas de la simbiosis, expresándose principalmente en pelos radicales.

ROP3 también podría ser un candidato interesante, si bien su expresión en *Lotus* no es tan alta en comparación con *ROP5* y *ROP6*, en *Medicago* (4H y 20H) y *Glycine* (12H) su expresión es alta; además es preciso mencionar que para el caso de *Medicago* existe una diferencia en la acumulación de transcritos entre el control y las muestras inoculadas, indicativo de una expresión diferencial; estos resultados hacen que nos planteemos la incógnita de si en *Lotus* dicho gen tendría un patrón similar de expresión a 4H y 12H tras la inoculación con la bacteria simbiótica.

Por último, en la *Figura 11* se agrupa la información correspondiente al perfil de expresión de los *ROP* en nódulos; para el caso particular de esta figura y dada la naturaleza de los datos sugerimos que la información recabada en ésta sea interpretada con cautela y solo como un indicativo del perfil de expresión de los *ROP* en nódulos de algunas especies de leguminosas.

Mencionamos lo anterior debido a que los tiempos de maduración de un nódulo varían entre las leguminosas citadas en la *Figura 11*, además de que *Medicago* desarrolla nódulos indeterminados; lo que dificulta el análisis y comparación de datos entre especies.

ROP3, *ROP5*, *ROP6* y *ROP9* son los genes que presentan un valor de expresión más alto en comparación con el resto; para el caso particular de *ROP5* y *ROP6* los datos recabados nos ayudan a reiterar que dichos genes tienen una probabilidad alta de desempeñar un papel dentro de la simbiosis, no solo en las etapas tempranas (horas después de la inoculación la bacteria simbiótica) sino también en el desarrollo del nódulo.

Para el caso de *ROP1*, *ROP3*, *ROP9* y *ROP10* podríamos hipotetizar que su participación se relaciona más con el desarrollo del nódulo.

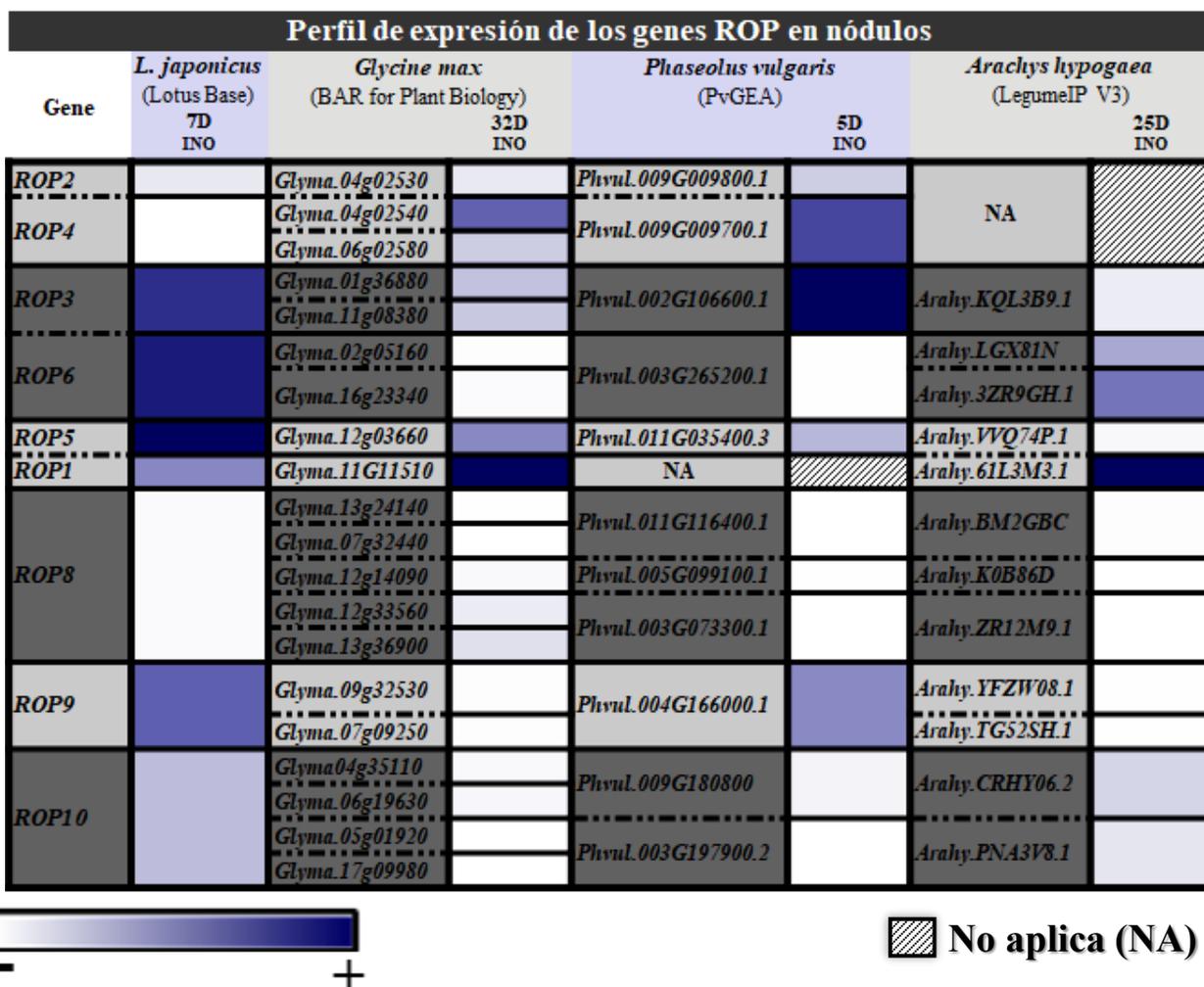


Figura 11. Esquema tipo “heat map” donde se representan los perfiles de expresión de los genes *ROP* en nódulos de *L. japonicus*, *G. max*, *P. vulgaris* y *A. hypogaea*. El color blanco indica el valor más bajo de expresión, en contraste la tonalidad azul oscuro representa el valor más alto.

Abreviaciones utilizadas en la figura: INO: Inoculado y D: Días.

Recabar la información correspondiente a los perfiles de expresión nos permitió realizar una preselección de los genes *ROP* que podrían llegar a desempeñar un rol en el proceso de simbiosis ya sea durante las etapas tempranas (*ROP5* y *ROP6*) o en el desarrollo del nódulo (*ROP1*, *ROP3*, *ROP9* y *ROP10*).

Asimismo, al realizar el análisis y comparación de datos para la elaboración de los esquemas descritos con anterioridad (*Figuras 9, 10 y 11*), nos percatamos de que existe una gran variabilidad entre los datos de expresión, incluso para un mismo gen; lo que impidió que identificáramos un patrón de expresión específico para cada gen.

Por lo tanto, esto nos motivó aún más para continuar con el tercer objetivo de este trabajo de investigación, que consistió en la creación de un mapa espacio temporal de la expresión de los genes *ROP* en *Lotus japonicus*; esto se realizó mediante la fusión transcripcional de cada promotor de los *ROP* con un gen reportero.

7. 3. Análisis *in silico* de las secuencias promotoras de los *LjROP*

Con la finalidad de complementar el análisis de la actividad de los promotores de los *LjROP*, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias promotoras con la finalidad de identificar elementos regulatorios de tipo *cis*.

Las secuencias promotoras de los genes *LjROP* (~ 2 kb río arriba del codón de inicio de la transcripción de cada gen) se sometieron al análisis en la base de datos New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>), revelando la presencia de cuatro elementos *cis* relacionados con la simbiosis, NODCON1GM, NODCON2GM, OSE1ROOTNODULE y OSE2ROOTNODULE, y un elemento que se expresa en el pelo radical, RHERPATEXPA7.

Los elementos *cis* NODCON1GM y NODCON2GM están asociados con nodulinas que se localizan en la membrana de los simbiosomas y en el espacio simbiosomal; mientras que OSE1ROOTNODULE y OSE2ROOTNODULE se asocian con promotores que son activados en las células infectadas de los nódulos.

En la **Tabla 4** se especifica el número de elementos *cis* presentes en cada una de las secuencias promotoras de los *LjROP*; resaltando *LjROP5* que, además de contar con todos los elementos mencionados con anterioridad, es la secuencia promotora que más sitios contiene, con un total de 21. Otros promotores como *LjROP1*, *LjROP4* y *LjROP8* carecen de los elementos *cis* NODCON1GM y OSE1ROOTNODULE; mientras que RHERPATEXPA7 está ausente en todos los promotores a excepción de *LjROP5*, *LjROP8* y *LjROP10*.

Tabla 4

Elementos <i>cis</i>	Promotores									
	<i>LjROP1</i>	<i>LjROP2</i>	<i>LjROP3</i>	<i>LjROP4</i>	<i>LjROP5</i>	<i>LjROP6</i>	<i>LjROP8</i>	<i>LjROP9</i>	<i>LjROP10</i>	
NODCON1GM	0	4	1	0	5	2	0	1	1	
NODCON2GM	6	4	3	6	5	3	6	3	2	
OSE1ROOTNODULE	0	4	1	0	5	2	0	1	1	
OSE2ROOTNODULE	6	4	3	6	5	3	6	3	2	
RHERPATEXPA7	0	0	0	0	1	0	1	0	2	
Total de elementos	12	12	8	12	21	10	13	8	8	

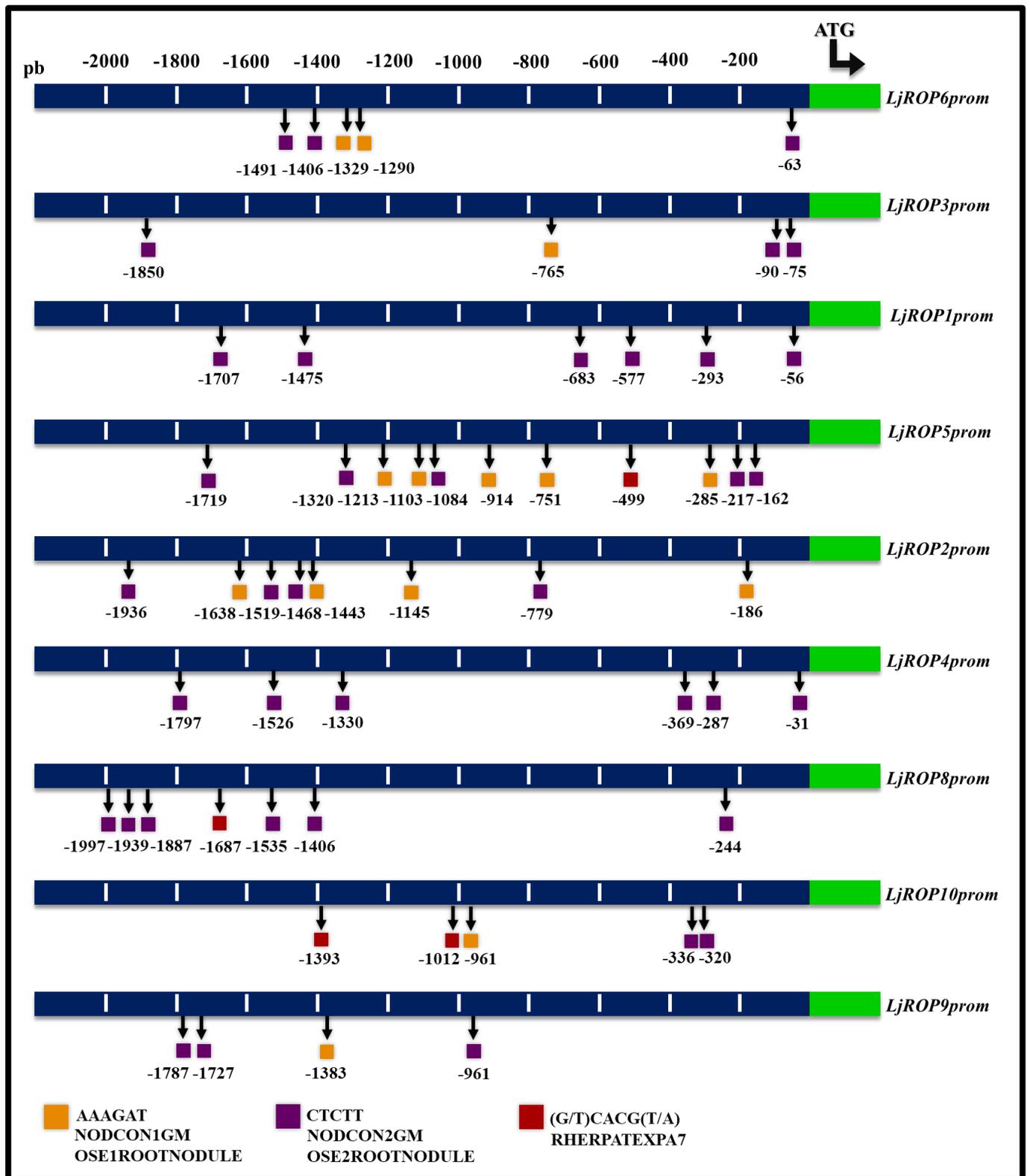


Figura 12. Distribución de los elementos *cis* en cada una de las secuencias promotoras de los genes *LjROP*.

En la *Figura 12*, se esquematiza la distribución de los elementos *cis* en cada una de las secuencias promotoras de los *LjROP*; es preciso mencionar que tal como se puede observar en la figura la posición de los elementos *cis* no se encuentra conservada en los promotores, pero resalta el hecho de que para la secuencia promotora de *LjROP5*, la mayoría de los elementos regulatorios se encuentren ubicados dentro de las primeras 1400 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción, mientras que el resto de los promotores mantienen un orden distinto.

Si recordamos los datos presentados con anterioridad, *LjROP5* es uno de los genes que tiene una expresión considerable en pelos radicales y en nódulos, que quizá pudiera deberse a la presencia de estos elementos *cis* en su secuencia promotora.

Otro punto interesante para destacar es que el promotor de *LjROP5* es uno de los que contiene un elemento *cis* relacionado con la expresión en pelos radicales (RHERPATEXPA7); lo que refuerza la hipótesis de que este gene podría llegar a desempeñar un rol durante la simbiosis.

7. 4. Evaluación de la actividad de los promotores *LjROP in vivo*

Como tercer objetivo del proyecto de investigación se planteó analizar la actividad de los promotores de *ROP in vivo*, esto se realizó con la ayuda de un gen reportero en raíces transformadas de *L. japonicus*.

Los primeros ensayos de transformación de plantas se llevaron a cabo con el vector vacío (plásmido pC GW mCherry 3x Venus) y con el promotor 35S (plásmido pC GW mCherry_35S 3x Venus), digiriendo la expresión de un gen que codifica para una proteína reportera fluorescente amarilla (Venus). El 35S es un promotor muy utilizado en biotecnología vegetal porque permite generar una expresión constitutiva, ubicua (presente en muchos o todos los tejidos de la mayoría de las plantas) y fuerte de las proteínas reporteras que se encuentran fusionadas transcripcionalmente con este promotor, lo que permite detectar de manera más sencilla estas proteínas. Debido a esto, en los primeros ensayos de transformación de plantas se incluyó al promotor 35S para asegurarnos que bajo las condiciones de observación de la raíz (parámetros de microscopia) se podría detectar la fluorescencia amarilla correspondiente al trímero de Venus.

Los ensayos de transformación fueron exitosos, y para el caso del promotor 35S fue posible detectar la fluorescencia amarilla en los núcleos (*Figura 11*). En la *Figura 13* se muestran dos imágenes de microscopia confocal de una raíz de *Lotus japonicus* transformada con el vector pC GW mCherry_35S Venus; en (**A**) se aprecian los núcleos celulares con una coloración amarilla indicativo de la actividad del promotor 35S. Para lograr esta visualización se utilizó un láser con longitud de onda de 488 nm, valor muy cercano al punto máximo de excitación de Venus (515 nm). En (**B**) se pueden observar las células de la raíz con una coloración roja, la cual proviene de la proteína fluorescente mCherry; esta coloración nos permite identificar y seleccionar las raíces que se encuentran transformadas con nuestro vector de interés, y al igual que el trímero de Venus el gen de la proteína mCherry se encuentra bajo la dirección de un promotor 35S que nos permite seleccionar las raíces transformadas.

La longitud de onda teórica para excitar ambas proteínas es muy cercana, mCherry-Ex λ 587 nm y Venus-Ex λ 515 nm, lo que podría generar un solapamiento entre ambas proteínas, lo que representa un problema al momento de querer observarlas de manera independiente.

Para lograr la visualización de esta imagen se empleó una longitud de onda de 559 nm para excitar la proteína roja, con una ventana de captura para la señal de 600 a 680 nm; y en el caso de la proteína amarilla la longitud fue de 488 nm, con una ventana de captura de 525 a 575 nm, parámetros sugeridos por el M. C. Andrés Martín Saralegui Amaro, técnico académico del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM.

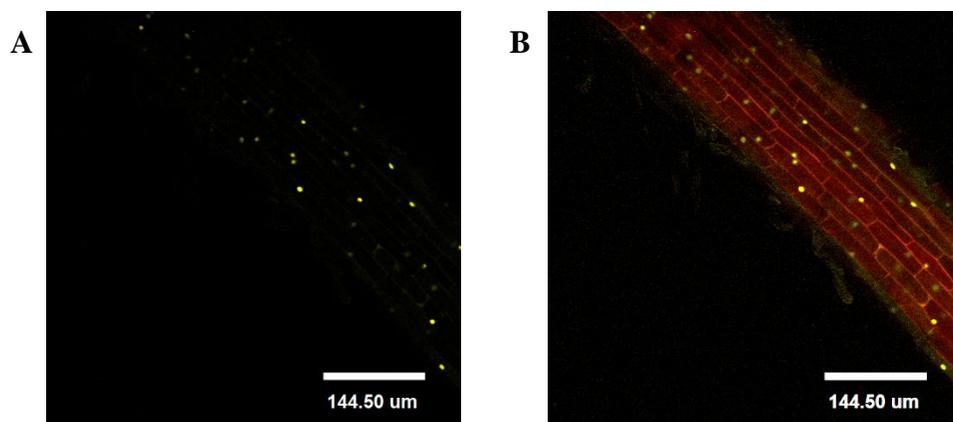


Figura 13. Imágenes de microscopio confocal de raíces transformadas de *Lotus japonicus* con el vector pC GW mCherry_35S Venus. (A) Fluorescencia amarilla en los núcleos de una raíz transformada. (B) Raíz transformada en coloración roja, núcleos amarillos indicativo de la actividad del promotor 35S. Imagen capturada con Microscopio confocal Olympus FV100 Multi-fotónico Upright BX61WI (Objetivo 20x).

Posteriormente se realizaron otros ensayos de transformación utilizando los promotores endógenos de *LjROP3* y *LjROP6*. Al momento de visualizar en el microscopio confocal las raíces transformadas de cada una de las construcciones, nos percatamos de que la señal que emitía la proteína fluorescente amarilla era muy tenue y por lo tanto fue muy complicado detectar los núcleos en las raíces transformadas mediante este método.

Además, fue necesario considerar que, si se deseaba analizar las raíces y generar imágenes microscópicas de buena calidad era necesario observar y capturar imágenes de distintas zonas

de la raíz; incluso es muy recomendable realizar “stacks” en Z, los cuales pueden tener una duración desde 5-7 minutos o hasta 15 o más dependiendo de qué tan fino sea.

Todo este proceso implicaba mucho tiempo, y más si se considera que no solamente se evaluó una raíz por cada construcción transformada. Por lo que se requirió buscar una alternativa que fuera más rápida para tener una visión global de la actividad de los promotores.

Para resolver este problema se ensambló un nuevo plásmido que contiene el gen reportero *GUS*. Este gen ha sido ampliamente descrito en estudios donde analizan la actividad de los promotores. Codifica para la enzima β -glucuronidasa (*GUS*), y los ensayos con esta enzima tienen la ventaja de ser muy sensibles, además de que nos permiten obtener datos tanto cualitativos (histoquímicos) como cuantitativos (fluorométricos).

Una ventaja importante de este sistema es que nos permitió transformar las plantas con las distintas construcciones de interés y analizar la actividad de los promotores de una manera global y más rápida, esto se debe a que una vez que realizas la tinción *GUS* se pueden fijar las raíces para posteriormente analizarlas de manera gradual, lo que ayudó a optimizar y organizar mejor los tiempos de experimentación.

Esta nueva construcción que contiene el gen *GUS* se deriva del plásmido pC GW mCherry 3x Venus, en el cual se realizó un corte con enzimas de restricción (*XbaI* y *AatII*) para retirar el triplete de *Venus* y sustituirlo por el gen *GUS*. Como resultado final se generó un nuevo vector pC GW mCherry_*GUS*, que nos permitió continuar con la evaluación de la actividad de los promotores.

7. 5. Ensayo histoquímico de GUS

La primera ronda de transformación de plantas se realizó con las construcciones pC GW mCherry_p35s: *GUS* y pC GW mCherry_*GUS* (vector vacío, sin promotor fusionado); la construcción con la fusión transcripcional del promotor 35s con *GUS* nos permitió verificar que las condiciones de experimentación empleadas (protocolo para tinción *GUS*, Ver Anexo V) eran las adecuadas, por lo cual las raíces transformadas de *Lotus japonicus* se tiñeron de color azul

en su totalidad. En contraste, las raíces transformadas con el vector vacío no se tornaron azules después de realizar la tinción; este vector nos permitió descartar la posibilidad de que las tinciones obtenidas en el resto de las construcciones se debieran a un efecto ocasionado por alguno de los elementos presentes en la construcción y no por la fusión transcripcional de cada promotor de los *LjROP* con *GUS*. Todas las raíces fueron incubadas a 37° C con la solución de tinción durante 12 horas.

Como puede observarse en la *Figura 14*, la tinción se distribuye a lo largo de una raíz transformada de *Lotus japonicus* (**A**), patrón de expresión que corresponde al promotor 35S, el cual generó una expresión constitutiva, ubicua y fuerte de *GUS*; en contraste la raíz transformada con el vector vacío (**B**) carece de coloración.

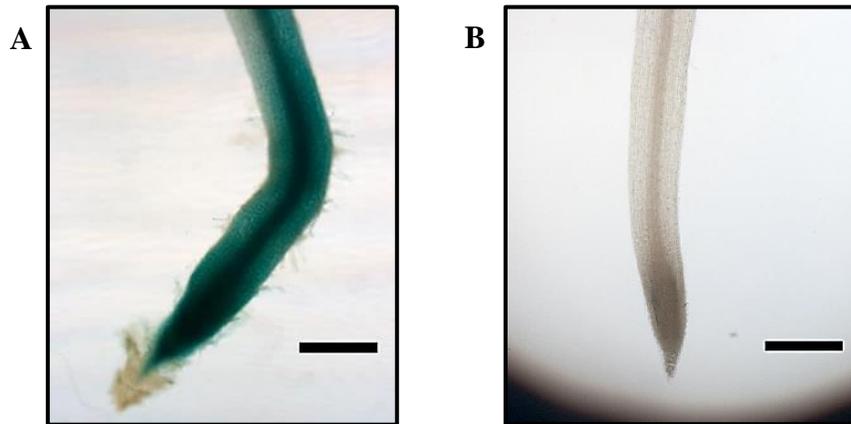


Figura 14. Imágenes de microscopia de campo claro de raíces transformadas de *Lotus japonicus* con los vectores pC GW mCherry_p35s GUS (**A**) y pC GW mCherry_GUS o vector vacío (**B**). (**A**) Coloración azul distribuida a lo largo de una raíz transformada, indicativo de la actividad de promotor 35s. (**B**) Raíz carente de coloración, resultado esperado para la transformación con el vector vacío. Imágenes capturas con el Microscopio Zeiss AxioSkop 2 Upright SKU 007 (**A**: Objetivo 5x / **B**: Objetivo 5x), barras = 500µm.

Una vez constatadas las condiciones experimentales, proseguimos a realizar la transformación y tinción del resto de las líneas promotoras. Fueron evaluados dos tiempos, tres y siete días después de la inoculación con la bacteria simbiótica *M. loti*, y cinco zonas de la raíz transformada: ápice, vasculatura, primordios de nódulos, primordios de raíz y pelos radicales.

Con la finalidad de simplificar el análisis de estos resultados, se elaboró un esquema a modo de “heat map” o mapa de calor, donde a cada uno de los tejidos y tiempos evaluados se les asignó un valor numérico de acuerdo con la intensidad de la coloración observada después de la tinción GUS, estos valores fueron procesados en un gradiente de color blanco a azul oscuro (Figura 15).

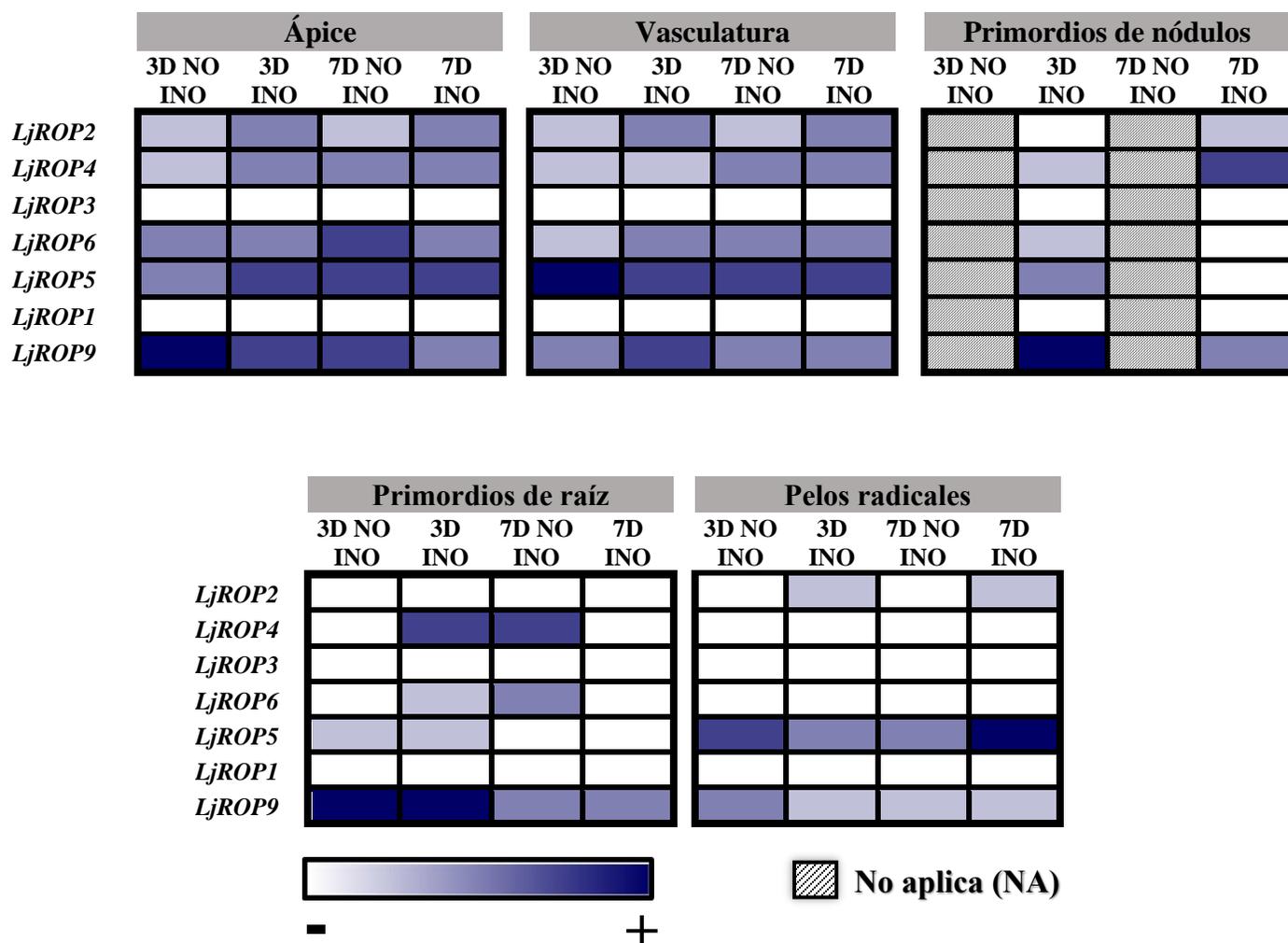


Figura 15. Esquema tipo “heat map” donde se representan los resultados del ensayo histoquímico de GUS. Fueron agrupados en cinco categorías de acuerdo con los tejidos evaluados, ápice, vasculatura, primordios de nódulos, primordios de raíz y pelos radicales. El color blanco indica los valores de expresión más bajos mientras que las tonalidades azul oscuro los más altos. **Abreviaciones utilizadas en la figura:** NO INO: No Inoculado, INO: Inoculado y D: Días.

Para realizar el análisis de la *Figura 15* nos enfocaremos en los resultados obtenidos para pelos radicales y primordios de nódulos. Para comenzar, uno de los puntos que captó nuestra atención fue la ausencia de tinción azul en todos los tejidos evaluados de las plantas transformadas con el promotor de *LjROP1* y *LjROP3*, de acuerdo a los datos de expresión obtenidos durante mi tesis de licenciatura y los perfiles de expresión recabados durante este trabajo de investigación, estos genes, especialmente *LjROP3*, se expresaban de manera considerable en raíz, pelos radicales y nódulos, lo que nos hizo hipotetizar que observaríamos tinción azul en cualquiera de los tejidos evaluados en el ensayo, pero desafortunadamente no fue así.

Lo anterior podría deberse a un defecto en la construcción que impidió su correcto funcionamiento o que tal vez en las secuencias promotoras utilizadas faltó algún elemento regulatorio situado río arriba de las ~ 2000 pares de bases que tienen los promotores empleados en las construcciones.

Por otra parte se comprobó que los resultados del ensayo histoquímico de GUS para *LjROP5* coinciden con el perfil de expresión descrito anteriormente para pelos radicales, además de reforzar la hipótesis de que los elementos *cis* encontrados en la secuencia promotora de dicho gen podrían haber influido en el patrón de expresión que observamos.

Asimismo para pelos radicales las líneas transformadas como los promotores de *LjROP2* y *LjROP9* presentaron coloración azul.

En el caso de los primordios de nódulos de 3 días la coloración fue más intensa para *LjROP9*, mientras que *LjROP6*, *LjROP5* y *LjROP4* mantienen valores similares de coloración; en contraste en el caso de los primordios de nódulos de 7 días solamente *LjROP9*, *LjROP4* y *LjROP2* presentaron coloración.

Estos resultados sugieren que dichos genes podrían llegar a desempeñar un papel en la simbiosis a nivel de nódulos, en especial *LjROP6* el cual de acuerdo con los perfiles de expresión evaluados es un candidato fuerte para estar involucrado en este proceso.

En la sección de *Anexos / Anexo XII*, se encuentran organizadas por tejidos las fotos de la tinción GUS de cada uno de los promotores de los genes *LjROP*; siguiendo el orden propuesto en el esquema estilo “*heat map*” se colocaron fotos de ápice, vasculatura, pelos radicales, primordios de nódulos y primordios de raíz.

8. Conclusiones

El objetivo global del presente trabajo de investigación fue el de caracterizar la expresión espacio temporal de los genes *ROP* durante las etapas tempranas de la simbiosis.

Para lo cual se realizó la comparación de la acumulación de transcritos de los genes *ROP* en el fondo genético mutante *rop3* y silvestre; encontrando que la acumulación de transcritos de *ROP3* en el fondo mutante *rop3* disminuyó drásticamente en comparación con el fondo silvestre; además estos resultados también complementaron los datos reportados por Daniel Castro en su tesis de licenciatura, donde observó que tras realizar la fenotipificación de la línea mutante *rop3* existía una disminución en el promedio de hilos de infección y en los eventos de nodulación en comparación con las plantas silvestres; eventos que probablemente están ligados a la disminución de transcritos de *ROP3* reportados en el presente trabajo de investigación.

De igual forma observamos que la ausencia de *ROP3* tiene un efecto en la acumulación de transcritos del resto de los genes *LjROP*, los cuales presentan un aumento en su acumulación de transcritos; nosotros proponemos que el aumento de transcritos tiene la finalidad de compensar la función de *ROP3* y que probablemente este mecanismo se realice a través de un bucle de retrocontrol, donde suponemos que en una planta silvestre la expresión de *ROP3* inhibe la expresión de los otros miembros de la familia.

Posteriormente continuamos con el análisis y comparación del perfil de expresión de los *ROP*, labor que permitió afinar y enriquecer los datos que fueron reportados durante mi tesis de licenciatura, gracias a la obtención de datos de expresión en tejidos de interés para fines del presente proyecto de investigación, como lo son los pelos radicales y nódulos; esta información no solo se recabó para nuestra leguminosa modelo *Lotus japonicus* sino para otras leguminosas como *M. truncatula*, *G. max*, *A. hypogaea* y *P. vulgaris*; además de que este análisis nos llevó a la identificación de los posibles ortólogos de los *LjROP* en estas especies.

Recabar dicha información nos permitió realizar una preselección de los genes de la familia *ROP* que podrían llegar a estar involucrados en el proceso de simbiosis; siendo nuestros

candidatos principales *ROP5* y *ROP6*, los cuales se expresan mayormente en pelos radicales, y *ROP1*, *ROP3*, *ROP9* y *ROP10* que tienen mayor expresión en nódulos en comparación con el resto de los genes.

Enfocados en estos candidatos continuamos con el desarrollo del mapa de expresión espacio temporal de los genes *LjROP* y con el análisis *in silico* de las secuencias promotoras de dichos genes.

El análisis *in silico* de las secuencias promotoras permitió identificar la presencia en ellas de elementos *cis* relacionados con la simbiosis, NODCON1GM, NODCON2GM, OSE1ROOTNODULE, OSE2ROOTNODULE y RHERPATEXPA7. La secuencia promotora de *LjROP5* es la que más sitios contiene, con un total de 21; este resultado captó nuestra atención porque desde que realizamos el análisis comparativo del perfil de expresión de los genes *LjROP*, *LjROP5* figuraba como un candidato fuerte para desempeñar un papel en la simbiosis; y con los resultados del análisis *in silico* de su promotor la probabilidad aumentó y más si se considera que dentro de los sitios para elementos *cis* contenía uno específico para expresión en pelos radicales, RHERPATEXPA7, que no se encuentran en todas las secuencias promotoras de los *LjROP*.

Proseguimos con los ensayos de tinción GUS y con el desarrollo del mapa de expresión espacio temporal, encontrando los siguientes resultados, en el caso de los primordios de nódulos a 3 días después de la inoculación la tinción azul fue más intensa para *LjROP9*, mientras que *LjROP6*, *LjROP5* y *LjROP4* mantienen una intensidad de coloración similar, para el caso de los primordios de nódulos de 7 días únicamente en *LjROP9*, *LjROP4* y *LjROP2* hubo tinción azul.

Es preciso señalar que en nuestro análisis bioinformático previo del perfil de expresión de los *LjROP* en nódulos encontramos que *LjROP1*, *LjROP3*, *LjROP9* y *LjROP10* son los genes que tienen mayor expresión, pero en nuestros resultados de tinción GUS únicamente *LjROP9* coincidió con la información recabada previamente.

Para el caso de los pelos radicales la tinción GUS mostró resultados interesantes para *LjROP5*, que no solo coinciden con el perfil de expresión descrito anteriormente sino que además su expresión es diferente bajo las condiciones evaluadas, raíces inoculadas y no inoculadas; lo que podría ser un indicio fuerte de su participación en la simbiosis; además de que refuerza el planteamiento de que los elementos *cis* encontrados en la secuencia promotora de dicho gen podrían estar influyendo en el patrón de expresión que observamos.

Debido a lo descrito a lo largo de este proyecto de investigación se propone a *LjROP5* como un gen con potencial para desempeñar un papel en el proceso de simbiosis, y se incentiva a continuar con su caracterización y estudio, proponiendo algunas alternativas en las perspectivas de este trabajo.

9. Perspectivas

Con la finalidad de continuar con este proyecto de investigación y de afinar los resultados obtenidos en el mismo, se sugiere repetir los experimentos de transformación de plantas con los promotores de *LjROP1* y *LjROP3*; estos genes se expresan de manera considerable en raíz, pelos radicales y nódulos, lo que nos llevó a hipotetizar sobre su posible participación en la simbiosis, por lo que repetir los ensayos de transformación y trabajar en el ensamblaje de una nueva construcción que incluya una versión distinta de estos promotores nos proporcionaría información valiosa para dilucidar el papel de dichos genes en la simbiosis, además permitirnos completar el mapa de expresión espacio – temporal de los genes *LjROP* en *Lotus japonicus* tras la inoculación con la bacteria simbiótica.

Siguiendo el mismo orden de ideas se propone incluir otros tiempos a evaluar en el mapa de expresión temporal, como dos, cuatro, ocho, doce y veinticuatro horas, estos experimentos nos permitirían analizar la etapa inicial de la simbiosis; y para el caso de la expresión en nódulos se sugeriría realizar ensayos a catorce, veintiuno y veintiocho días, con la finalidad de tener datos para primordios de nódulos, nódulos maduros y senescentes. Se podría comenzar con *LjROP5* y *LjROP6* que son los candidatos que de acuerdo con nuestros resultados podrían tener mayor probabilidad de desempeñar un papel en la simbiosis. Una vez terminado el mapa de expresión espacio temporal para estos genes, los ensayos se podrían hacer extensivos para el resto de los genes *LjROP*.

Recordemos que los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo de investigación fueron planteados por practicidad para tres y siete días después de la inoculación con la bacteria simbiótica, lo que creo una ventana de información muy reducida, la cual podría ampliarse y enriquecerse si se continua con los experimentos propuestos en los párrafos anteriores.

Por otra parte, aprovechando la ventaja de contar con una línea mutante para *LjROP5*, sería muy interesante evaluar la expresión de diversos genes marcadores de la simbiosis en el fondo mutante *rop5*. Este tipo de ensayo se realizó para este proyecto en el fondo mutante *rop3*, pero

solo se evaluaron dos genes marcadores de la simbiosis *NIN* y *NF-YA*. Si consideramos que la vía simbiótica común es muy compleja y abarca un gran número de genes, evaluar la expresión de solo dos de estos genes no nos permitiría determinar a ciencia cierta si los genes ROP están involucrados de manera directa o indirecta en esta cascada de señalización.

Por último, se propone realizar ensayos fluorométricos con GUS. Este tipo de pruebas nos permitirían generar datos cuantitativos al momento de realizar el mapa de expresión espacio - temporal de los *LjROP*. Para eso, se necesitaría sustituir el sustrato para la tinción histoquímica de GUS (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido_X-Gluc) por el 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido_MUG).

10. Anexos

I. Composición de la solución nutritiva B&D

		Concentración final en 1X de B&D	Stock	
Sol. A:	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1000 µM	294.1 g/L	(2 M)
Sol. B1:	KH ₂ PO ₄	500 µM	68.0 g/L	(0.5 M)
Sol. B2:	K ₂ HPO ₄	500 µM	87.0 g/L	(0.5 M)
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O		114.1 g/L	(0.5 M)
Sol. C:	Citrato de Fe	10 µM	4.8 g/L	(20 mM)

		Concentración final en 1X de B&D	Stock	500 mL
Sol. D (1 L):	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250 µM	123.3 g	61.65 g
	K ₂ SO ₄	1500 µM K, 500 µM S	87.0 g	43.5 g
	MnSO ₄	1 µM	338.0 mg	169 mg
	H ₃ BO ₃	2 µM	247.0 mg	123.5 mg
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 µM	287.5 mg	143.8 mg
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2 µM	115.0 mg	57.5 mg
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 µM	56.0 mg	28.0 mg
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1 µM	48.0 mg	24.0 mg

		Concentración final en 1X de B&D	Stock	
Sol. E:	KNO ₃	1000 µM	101.0 g/L	(1 M)

1X B&D con 0.5 mM de KNO₃:

Tomar 0.5 mL por litro de 1X B&D de solución A, C, D y E; y 1.0 mL de 1X B&D de solución B1 y B2. Ajustar el pH a 6.8.

B&D con nitrógeno:

Sol. A, C y D 0.5 mL / L

Sol. B1 y B2 1.0 mL / L

Sol. E 1.0 mL / L

II. Composición del medio TY (Tryptone Yeast)

Triptona	6 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
CaCl ₂	0.38 g/L
Bacto-agar	1.6 g/L

Disolver los primeros tres ingredientes en agua destilada. Si se desea preparar medio sólido, agregar agar. NO MEZCLAR. La autoclave fundirá y mezclará el agar de manera apropiada.

III. Mapa del plásmido pMiniT

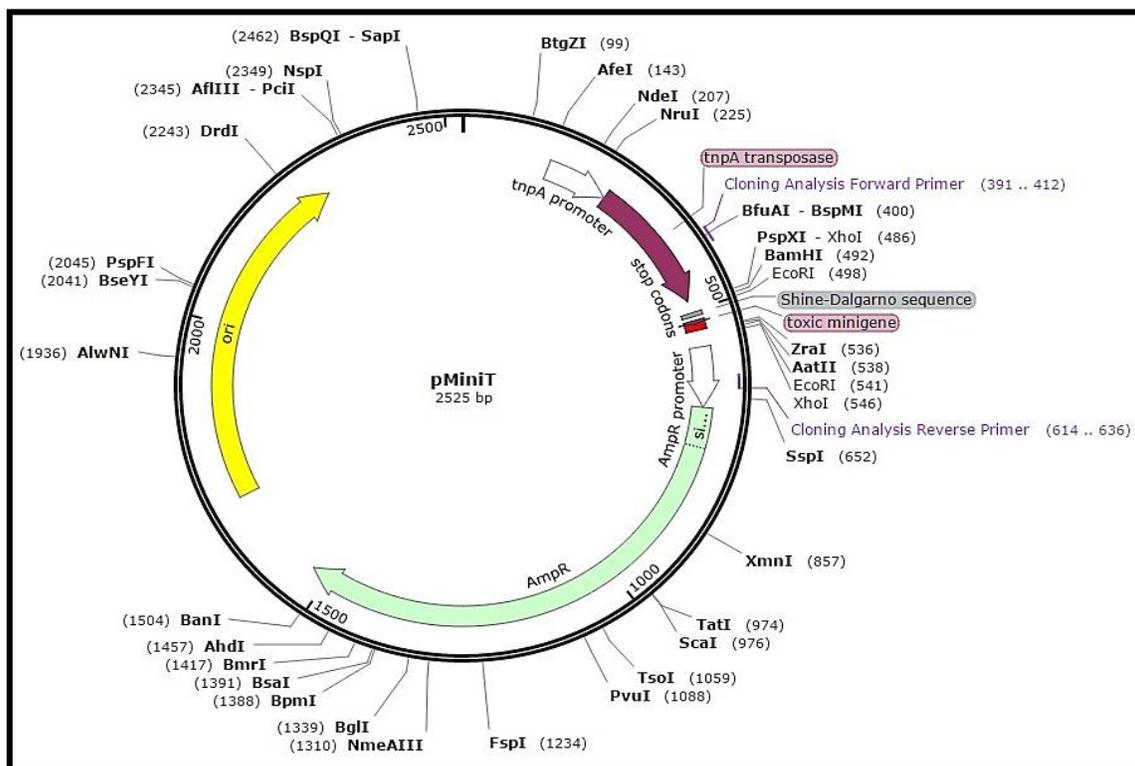


Figura S1. Mapa del plásmido pMiniT que muestra su construcción sin la presencia del inserto (promotor). Los sitios de restricción únicos se muestran en negro. Los sitios de restricción adicionales que se pueden usar para subclonar se muestran en gris. Con coloración morada se señala la ubicación de los oligonucleótidos para secuenciación y con rojo el sitio de inserción dentro del mini gen tóxico. Tomado del manual de instrucciones NEB PCR Cloning Kit #E1203S®.

IV. Protocolo de transformación de bacterias competentes mediante choque térmico

A un tubo con bacterias competentes agregar una disolución del plásmido de interés para que quede a una concentración de 10-15 ng / μ L; mezclar suavemente y mantener durante media hora en hielo.

Posteriormente colocar el tubo a 42° C durante un minuto (puede ser utilizado un termoblock); inmediatamente después regresar el tubo con la muestra al hielo, y dejarlo ahí durante un minuto, transcurrido el tiempo se añadirá 1 mL de LB o SOC, este último paso es importante realizarlo en la campana de flujo laminar.

Incubar a 37° C con agitación durante una hora; a continuación, centrifugar para precipitar las células y retirar todo el sobrenadante excepto 200 μ L, resuspender con una pipeta las células de manera suave. Por último, se plaquearán los 200 μ L en una caja con medio LB sólido y el antibiótico utilizado como medio de selección, sellar la caja con parafilm e incubar a 37°C durante una noche.

V. Mapa del plásmido pC GW mCherry_LjROP3p-GUS

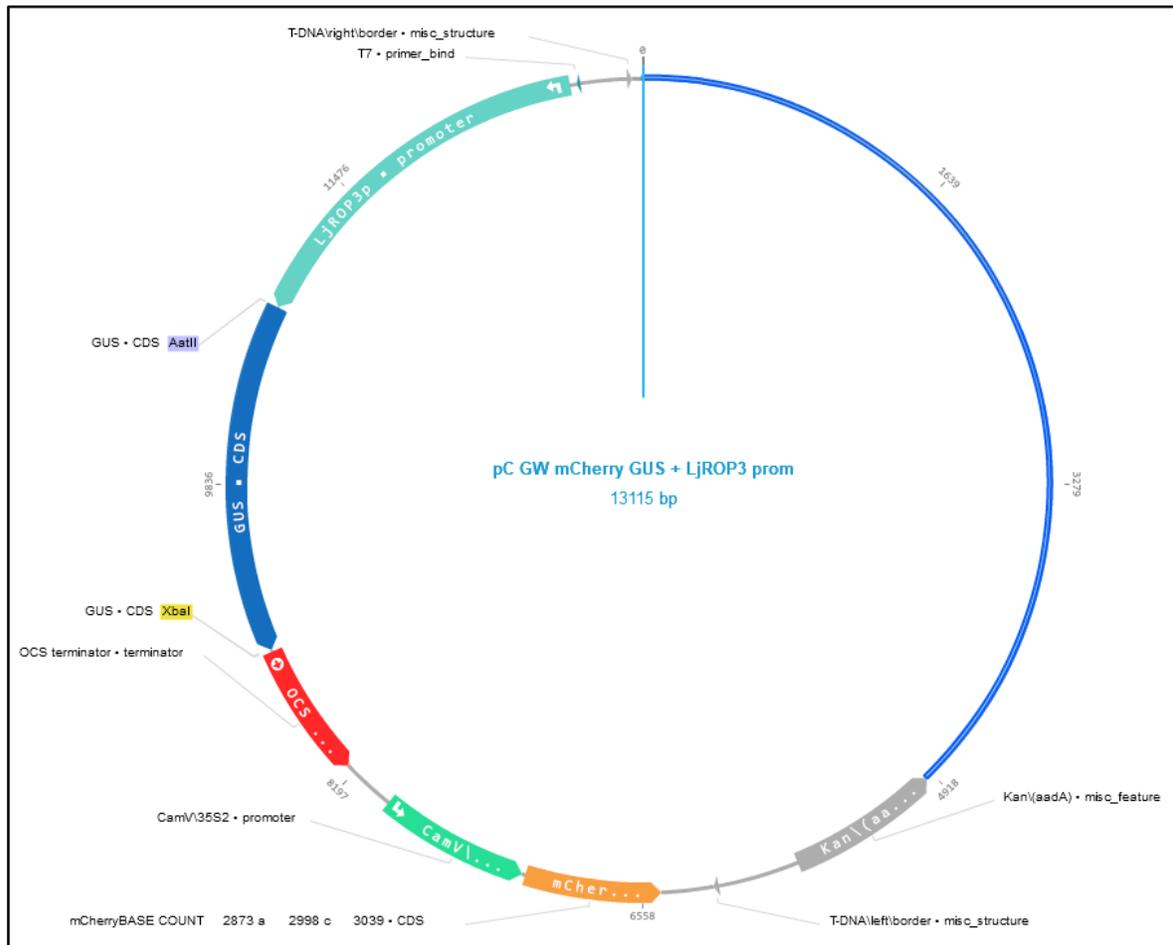


Figura S2. Mapa del plásmido pc GW mCherry_LjROP3p-GUS que muestra su construcción con la presencia de la secuencia promotora de *LjROP3*. Generado con el programa informático Genome Compiler.

VI. Protocolo para la transformación de *Agrobacterium* mediante electroporación

Diluir el plásmido a una concentración de 15 ng / μ L, posteriormente mezclar 2 μ L del plásmido diluido en 50 μ L de *Agrobacterium* en un tubo de 1.5 mL.

Transferir la mezcla en una cubeta para electroporación que haya sido enfriada durante 20 minutos a -20° C, después agregar por un costado de la cubeta las células; golpear hacia abajo ligeramente para eliminar las burbujas de aire.

Programar el electroporador a 2.00 V (dejar los otros ajustes por default: 200 Ω , extensor de capacitancia 250 μ FD, capacitancia 25 μ FD).

Inmediatamente después agregar un 1 mL de LB o SOC a la cubeta y mezclar con movimientos de pipeteo de arriba hacia abajo, transferir 1 mL a un microtubo para centrifuga. Incubar a 28° C durante 2 a 3 horas antes de plaquear ~ 70 μ L en cajas con LB + Rifampicina. Incubar las cajas a 28°C de 2 a 3 días.

VII. Oligonucleótidos para RT-qPCR

Tabla 5

Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR

Gen	Forward	Reverse	Producto (pb)
<i>LjROP1</i>	AAGAGAAAGGGGCAAAAAGC	ACCCGGAAAAGGCTACAGTC	95
<i>LjROP2</i>	TGGTTCTGCAACCGCCAAAG	GCCAGACAGTCACTACCTCCTAA	108
<i>LjROP3</i>	TGTCCTTCAACCACCTAAGCAA	GAAGGGGAGGGAAATACAGG	124
<i>LjROP4</i>	CAAGAGGAAGGCACAGAAGG	GAGAGGTTTCGTGAAGCTTGG	104
<i>LjROP5</i>	AAGTAGTTCTCCAGCCCCCA	GAATGGCGAAGACTACCAGGA	129
<i>LjROP6</i>	GGCATAAGAGTTGTGCTTCA	GAACCAATGGCTGTCAATTGTG	121
<i>LjROP8</i>	TGCAGCCACCTAAACCAAAGA	CCGAATGCTACAGATTGCGA	97
<i>LjROP9</i>	AGGTCTGGCTGCTCATTTGT	TGTCCTTCAACCACCTAAGCAA	119
<i>LjROP10</i>	TCCACAAAAGCAACAGGAGA	GCAAACCTCCAGCCAAGTGAT	198
<i>NIN</i>	TGGATCAGCTAGCATGGAAT	TCTGCTTCTGCTGTTGTAC	129
<i>NF-YA</i>	GAAGCTGCTTCAACCTTAAAGTC	CGAGATGTAGAAGTGAAGTTGTCA	160

Tabla 6

Oligonucleótidos de genes normalizadores para RT-qPCR

Gen	Forward	Reverse
<i>PP2A</i>	GTAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC
<i>TB2C</i>	GCTCACCAACCCCAAGCTTTGG	TGTCAATGGAGCAAACCCAACC
<i>ATP</i>	AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG	CAATGTCGCCAAGGCCCATGGTG

VIII. Oligonucleótidos para añadir sitios de corte enzimático a las secuencias promotoras

Tabla 7

Oligonucleótidos para añadir sitios de corte enzimático

Promotor	Forward	Reverse
LjROP1	ACTGGT CGAC GCATTAGCCCCACGAGGAA	ACTGGAAT TCGACGTC TCTAATCAGAAACCCTAATCAAATCA
LjROP2	ACTGGT CGAC TTTTGGCGGTTTAAATGGACATTGC	ACTGGAAT TCGACGTC GATCTATCAGAACCAACAATGCCCC
LjROP3	ACTGGT CGAC GGTCCAAAACATCAAACCCTCA	ACTGGAAT TCGACGTC TTCTCTCCACCTCCTCTAGC
LjROP4	ACTGGT CGACA AAGAGTGCTAACGCTTGTGGCT	ACTGGAAT TCGACGTC GTATCTGAACCAACAACAGTGTT
LjROP5	ACTGGT CGAC TCTAAATGCTGTCCATACGTAAC	ACTGGAAT TCGACGTC GAACCCAGTTGAAGTGTGTCAA
LjROP6	ACTGGT CGAC CTTGTTTTCTTTCAAATCTTCACA	ACTGGAAT TCGACGTC ACTCTTCTTCTCACCTCAAAAAGCA
LjROP9	ACTGGT CGAC TCTACTCTGTAGCTTTAGATGCA	ACTGGAAT TCGACGTC TAAATATAGAAAGCCTCAAAAGTTGGA
35S	ACTGGT CGAC TCGACTAGAGCCAAGCTGA	ACTGGAAT TCGACGTC TCGACTAGAATAGTAAATTGTAAT

En color azul se señalan algunos nucleótidos extra adicionados para mejorar la eficiencia de corte de las enzimas, con color rojo se indica el sitio de corte enzimático: Forward – SalI y Reverse – EcoRI-AatII, y por último en negro se muestra la secuencia de hibridación específica para cada promotor.

IX. Oligonucleótidos par amplificar el gen *GUS*

Tabla 8

Oligonucleótidos empleados para amplificar *GUS*

Gen	Forward	Reverse
<i>GUS</i>	ACTGG ACGTC ATGTTACGTCCTGTAGAAACCC	ACTGT CTAGAT CATTGTTTGCCTCCCTGCTG

En color azul se señalan algunos nucleótidos extra adicionados para mejorar la eficiencia de corte de las enzimas, con color rojo se indica el sitio de corte enzimático: Forward – AatII y Reverse – XbaI, y por último en negro se muestra la secuencia de hibridación específica del gen.

X. Soluciones y protocolo para tinción GUS

El protocolo descrito a continuación, es una adaptación realizada por Kirsten Bomblies en 2007 del protocolo de François Parcy.

Solución de tinción 1X (Se puede almacenar hasta por seis semanas a 4° C)

1M KPO ₄ (10X)	20 mL
0.1M K ₃ Fe (CN) ₆	1 mL
0.1M K ₄ Fe (CN) ₆	1 mL
0.5M Na ₂ EDTA	2 mL
Metanol	40 mL
H ₂ O Milli-Q	<u>136 mL</u>
	200 mL

Inmediatamente antes de utilizar, adicionar 20 µL de X-GLUC (25 mg/mL) por cada mililitro de buffer para tinción (1X).

Soluciones stock: Buffer de tinción

- 1) 1M KPO₄ (Almacenar a 4° C) 10X

	1 L	2 L
KH ₂ PO ₄	53.06 g	106.12 g
K ₂ HPO ₄	106.24 g	212.48 g

	10 mL	20 mL
2) 0.1M K ₃ Fe (CN) ₆	0.3293 g	0.6585 g
3) 0.1M K ₄ Fe (CN) ₆	0.4224 g	0.8448 g
4) 0.5M Na ₂ EDTA	1.8610 g	3.7220 g

- 5) X-GLUC: 25 mg/mL in DMF o DMSO (Proteger de la luz).

Protocolo para tinción GUS

- Preparar el buffer de tinción y agregar la cantidad adecuada de X-GLUC.
- En una placa de 24 reacciones, adicionar 1 mL de solución de tinción a cada uno de los pozos que serán utilizados.

- Colocar las raíces en cada pozo, procurando que estas permanezcan cubiertas con la solución de tinción, inmediatamente después cubrir la placa con papel aluminio e incubar por un par de horas o durante la noche a 37° C.
- Si se desean teñir nódulos grandes, infiltrar al vacío con la solución de tinción por ~ 15 minutos antes de incubar a 37° C.
- Después de la tinción, las raíces serán lavadas un par de veces con 1X KPO₄ (sin los KFeCNs) durante 10 minutos. Posteriormente se realizarán dos lavados de 5 minutos con H₂O.

Protocolo para aclaración de tejidos

- Incubar el tejido en 0.24M HCl, 20% Metanol durante 15 minutos a 57° C. Terminados los 15 minutos retirar el volumen de HCl-Metanol.
- A continuación, incubar el tejido en 7% NaOH, 60% Etanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación se retirará el volumen de NaOH-Etanol.
- En seguida, se comenzará con la rehidratación del tejido en soluciones seriadas de etanol durante 5 minutos para cada una: 40%, 20% y 10%.
- Infiltrar al vacío por 15 minutos en 5% Etanol, 25% Glicerol.

Para finalizar, las placas podrán ser selladas con parafilm y almacenadas a 4° C hasta su procesamiento.

Solución 0.24M HCl, 20% Metanol

1.97mL HCl / 100mL
20mL MeOH / 100 mL

Solución 7% NaOH, 60% Etanol

7g NaOH / 100mL
60mL EtOH / 100mL

XI. Números de acceso para los genes ROP en distintas especies vegetales

Tabla 9

Arachis hypogaea

Gen	Número de acceso
	Arahy.61L3M3.1
	Arahy.3ZR9GH.1
	Arahy.LGX81N
	Arahy.KQL3B9.1
	Arahy.VVQ74P.1
	Arahy.CRHY06.2
	Arahy.PNA3V8.1
	Arahy.YFZW08.1
	Arahy.TG52SH.1
	Arahy.BM2GBC
	Arahy.K0B86D
	Arahy.ZR12M9

Tabla 11

Glycine max

Gen	Número de acceso
	Glyma.01G164200.1
	Glyma.04G023400.1
	Glyma.04G180200.1
	Glyma.02G046100.1
	Glyma.04G023300.1
	Glyma.05G035200.1
	Glyma.06G184500.1
	Glyma.07G084200.1
	Glyma.06G023300.1
	Glyma.07G203100.1
	Glyma.09G192700.1
	Glyma.17G092100.1
	Glyma.16G124400.1
	Glyma.11G079100.1
	Glyma.11G107700.1
	Glyma.12G032700.1
	Glyma.13G293100.1
	Glyma.13G172600.1
	Glyma.12G208000.1
	Glyma.12G120600.1

Tabla 10

Phaseolus vulgaris

Gen	Número de acceso
	Phvul.009G180800.1
	Phvul.009G009800.1
	Phvul.009G009700.1
	Phvul.005G099100.1
	Phvul.004G166000.1
	Phvul.003G265200.1
	Phvul.002G106600.1
	Phvul.011G116400.1
	Phvul.003G073300.1
	Phvul.011G035400.1
	Phvul.003G197900.1

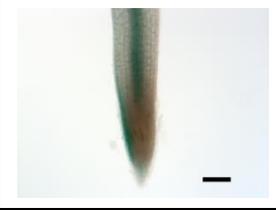
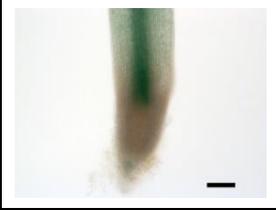
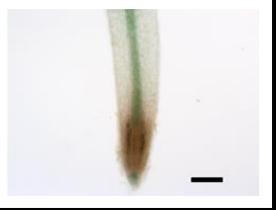
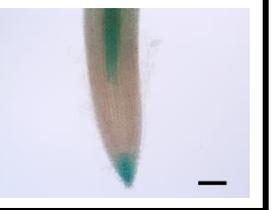
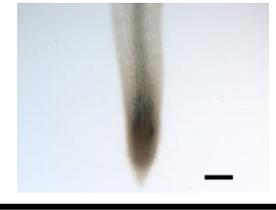
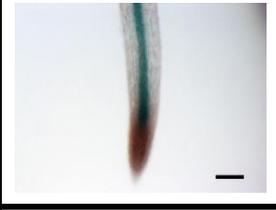
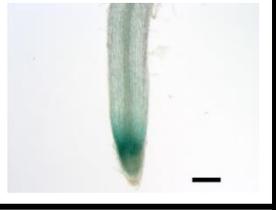
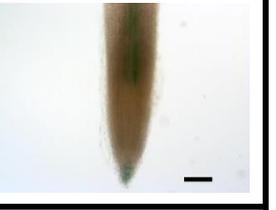
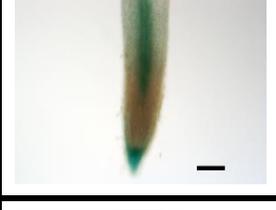
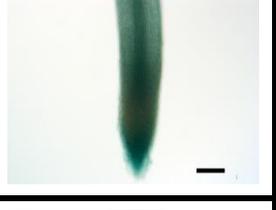
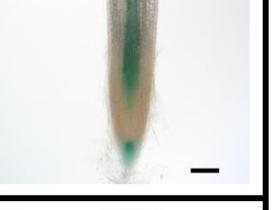
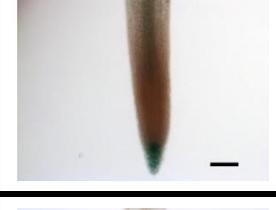
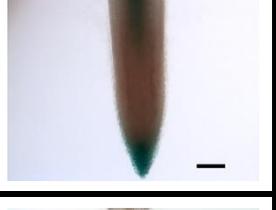
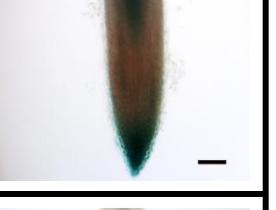
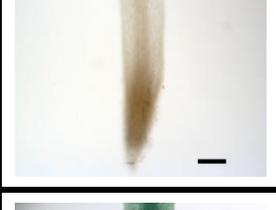
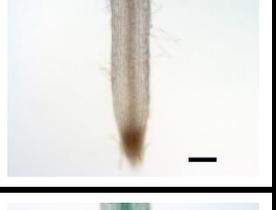
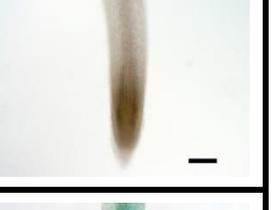
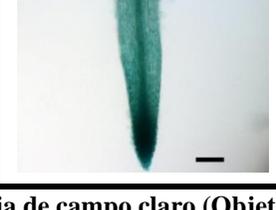
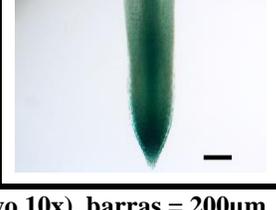
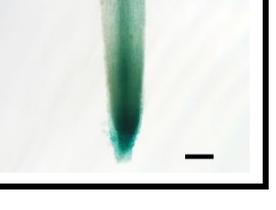
Tabla 12

Medicago truncatula

Gen	Número de acceso
<i>MtROP3</i>	Medtr5g022600
<i>MtROP5</i>	Medtr8g075240
<i>MtROP6</i>	Medtr4g073250
<i>MtROP7</i>	Medtr4g088055
<i>MtROP8</i>	Medtr2g090875
<i>MtROP9</i>	Medtr6g087980
<i>MtROP10</i>	Medtr3g078260

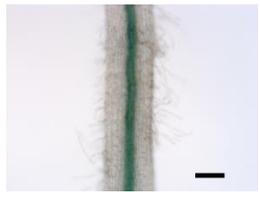
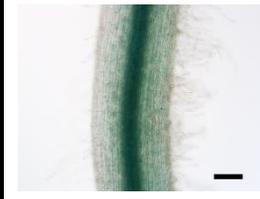
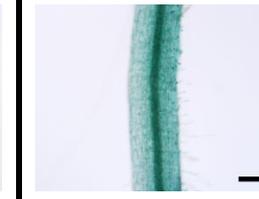
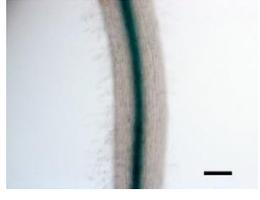
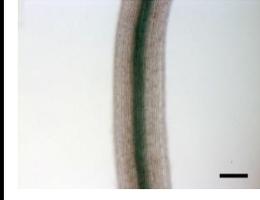
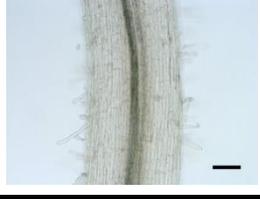
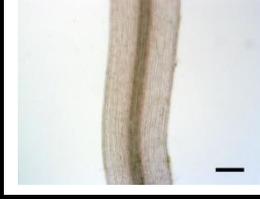
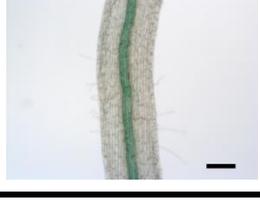
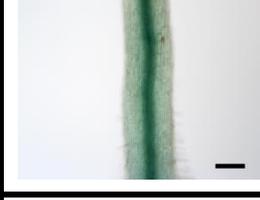
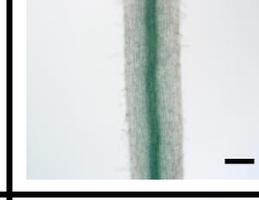
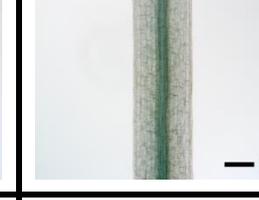
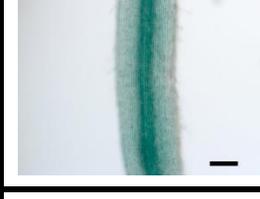
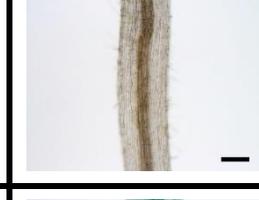
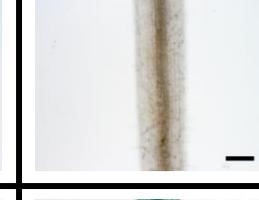
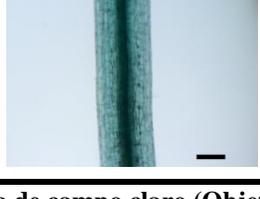
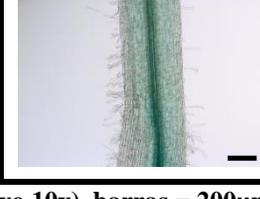
XII. Fotografías del ensayo histoquímico de GUS

Ápice

Promotor	3D NO INO	3D INO	7D NO INO	7D INO
<i>LjROP2</i>				
<i>LjROP4</i>				
<i>LjROP3</i>				
<i>LjROP6</i>				
<i>LjROP5</i>				
<i>LjROP1</i>				
<i>LjROP9</i>				

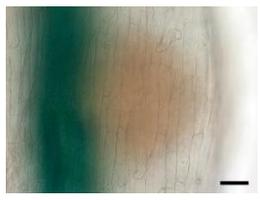
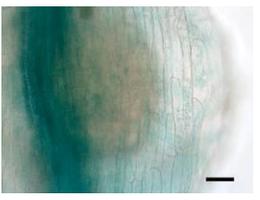
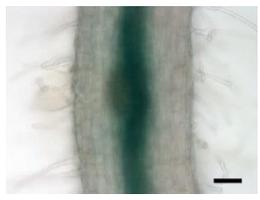
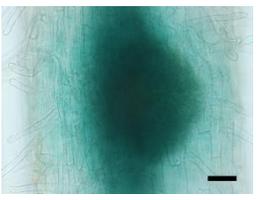
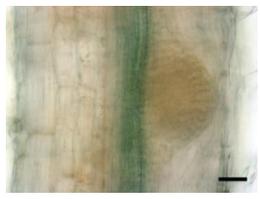
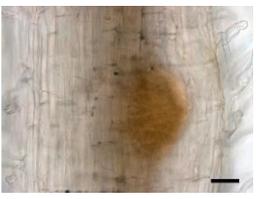
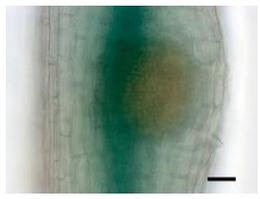
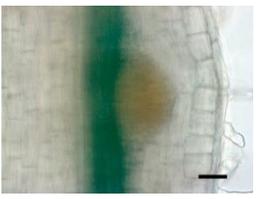
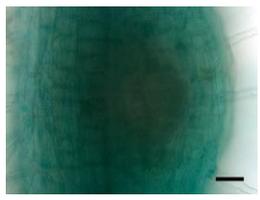
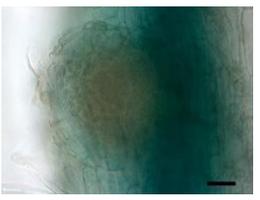
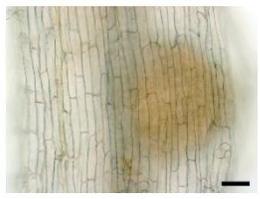
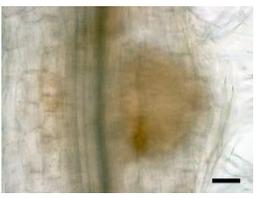
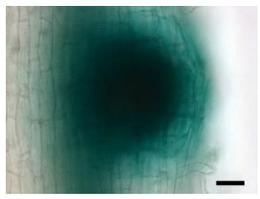
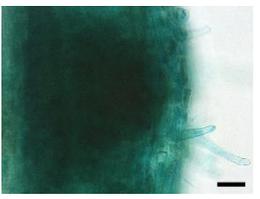
Microscopia de campo claro (Objetivo 10x), barras = 200µm.

Vasculatura

Promotor	3D NO INO	3D INO	7D NO INO	7D INO
<i>LjROP2</i>				
<i>LjROP4</i>				
<i>LjROP3</i>				
<i>LjROP6</i>				
<i>LjROP5</i>				
<i>LjROP1</i>				
<i>LjROP9</i>				

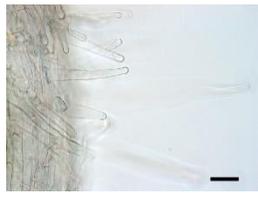
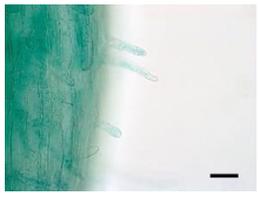
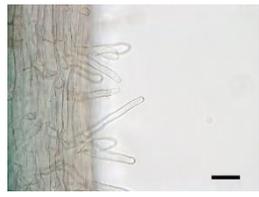
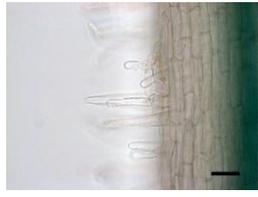
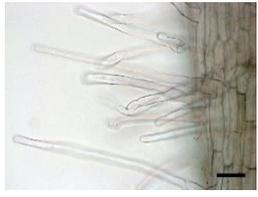
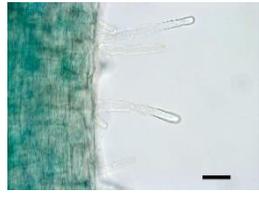
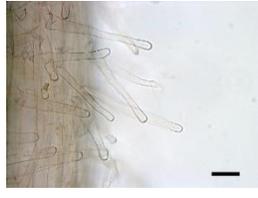
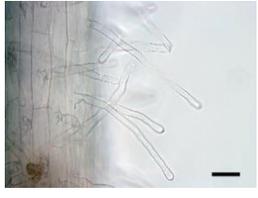
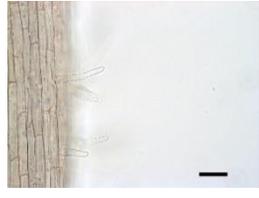
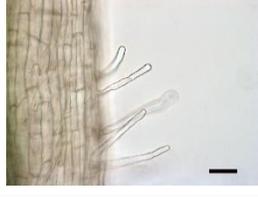
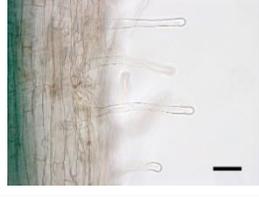
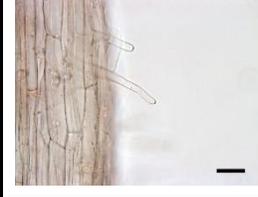
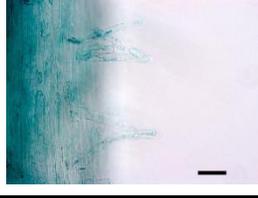
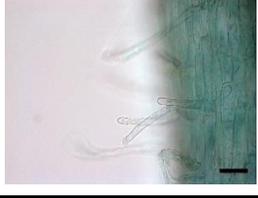
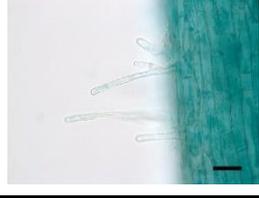
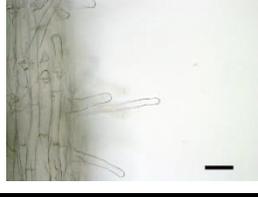
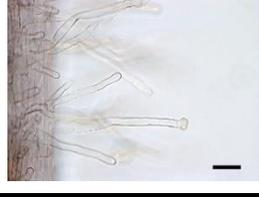
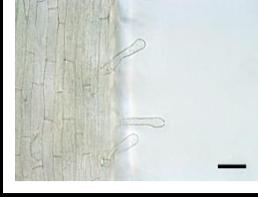
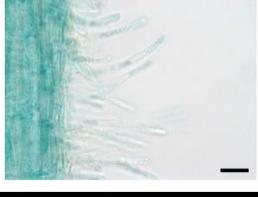
Microscopia de campo claro (Objetivo 10x), barras = 200µm

Primordios de nódulos

Promotor	3D INO	7D INO
<i>LjROP2</i>		
<i>LjROP4</i>		
<i>LjROP3</i>		
<i>LjROP6</i>		
<i>LjROP5</i>		
<i>LjROP1</i>		
<i>LjROP9</i>		

Microscopia de campo claro (Objetivo 40x), barras = 50µm

Pelos radicales

Promotor	3D NO INO	3D INO	7D NO INO	7D INO
<i>LjROP2</i>				
<i>LjROP4</i>				
<i>LjROP3</i>				
<i>LjROP6</i>				
<i>LjROP5</i>				
<i>LjROP1</i>				
<i>LjROP9</i>				

Microscopia de campo claro (Objetivo 40x), barras = 50µm

Primordios de raíz

Promotor	3D NO INO	3D INO	7D NO INO	7D INO
<i>LjROP2</i>				
<i>LjROP4</i>				
<i>LjROP3</i>				
<i>LjROP6</i>				
<i>LjROP5</i>				
<i>LjROP1</i>				
<i>LjROP9</i>				

Microscopia de campo claro (Objetivo 20x), barras = 100µm

11. Referencias bibliográficas

- Blanco, A., Peltzer Meschini, E., Zanetti, M., y Aguilar, O. (2009).** A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-*Rhizobium* symbiotic association. *The Plant Cell*, 21 (9), 2797-2810.
- Benfey, P., Ren, L., y Chua, N. (1990).** Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *The EMBO journal*, 9 (6), 1685 – 1696.
- Berken, A. (2006).** ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (21), 2446-2459.
- Berken, A., y Wittinghofer, A. (2008).** Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant physiology and biochemistry*, 46 (3), 380–393.
- Bøckman, O. C. (1997).** Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: Perspectives for future agriculture. *Plant and Soil*, 194, 11–14.
- Castro, J. (2019).** *Genotipificación y fenotipificación de los mutantes de Lotus japonicus rop X, 3, 6, 10*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Estados Unidos Mexicanos.
- Cruz, Y. (2018).** *Evaluación de los promotores endógenos de las proteínas ROPs en Lotus japonicus*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Estados Unidos Mexicanos.
- Dalal, J., Yalamanchili, R., La Hovary, C., Ji, M., Rodriguez-Welsh, M., Aslett, D., ... Qu, R. (2015).** A novel gateway-compatible binary vector series (PC-GW) for flexible cloning of multiple genes for genetic transformation of plants. *Plasmid*, 81, 55–62.

- Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., y Maiti, I. (2015).** Synthetic promoters in planta. *Planta*, 242 (5), 1077–1094.
- Díaz, L., Grønlund, M., Schlaman, M., y Spaink, P. (2005).** Induction of hairy roots for symbiotic gene expression studies. In A. J. Márquez (Ed.), *Lotus japonicus Handbook* (pp. 261–277).
- Downie, J. A. (2014).** Legume nodulation. *Current Biology*, 24 (5), 184–190.
- FAO. (2009).** La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. *Como alimentar al mundo 2050: Foro de expertos de alto nivel*. Recuperado de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
- Ferguson, B. (2017).** Rhizobia and legume nodulation genes. *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier.
- Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D., y Gresshoff, P. (2010).** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (1), 61–76.
- Fletcher, D., y Mullins, D. (2010).** Cell mechanisms and cytoskeleton. *Nature*, 463 (7280), 485–492.
- Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S., y Hayashi, M. (2012).** Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon *LORE1*. *The Plant Journal*, 69, 720–730.

- Gavrilovic, S., Yan, Z., Jurkiewicz, A., Stougaard, J., y Markmann, K. (2016).** Inoculation insensitive promoters for cell type enriched gene expression in legume roots and nodules. *Plant Methods*, 12 (1), 1-14.
- Goley, E., y Welch, M. (2006).** The ARP2/3 complex: an actin nucleator of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (10), 713-726.
- Graham, P., y Vance, C. (2003).** Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131 (3), 872–877.
- Hall, A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279 (5350), 209-514.
- Handberg, K., y Stougaard, J. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2 (4), 487–496.
- Homrich, M., Wiebke-Strohm, B., Weber, R., y Bodanese-Zanettini, M. (2012).** Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology*, 35 (4), 998–1010.
- Jefferson, A., Kavanagh, A., y Bevan, W. (1987).** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Molecular Biology Organization Journal*, 6, 3901-3907.
- Jones, T., Taylor, R., y Thornton, M. (1992).** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8, 275-282.
- Karimi, M., Inzé, D., y Depicker, A. (2002).** Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7 (5), 193-195.

- Ke, D., Fang, Q., Chen, C., Zhu, H., Chen, T., Chang, X., Yuan, S., Kang, H., Ma, L., Hong, Z., & Zhang, Z.** (2012). The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant physiology*, *159* (1), 131–143.
- Ke, D., Li, X., Han, Y., Cheng, L., Yuan, H., y Wang, L.** (2016). ROP6 is involved in root hair deformation induced by Nod factors in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *108*, 488–498.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547-1549.
- Ladha, J., Tirol-Padre, A., Reddy, C., Cassman, K., Verma, S., Powlson, D., ... Pathak, H.** (2016). Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. *Scientific Reports*, *6* (19355), 1-9.
- Liu, W., Chen, A., Luo, L., Sun, J., Cao, L., Yu, G., ... Wang, Y.** (2010). Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52* (7), 639–652.
- Ma, J.** (2018). Promoter fusions to study gene expression. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- Madsen, L., Fukai, E., Radutoiu, S., Yost, C., Sandal, N., Schausser, L., y Stougaard, J.** (2005). LORE1, an active low-copy-number TY3-*gypsy* retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, *44*, 372-381.
- NEB.** (2019). Troubleshooting guides: PCR troubleshooting guide. Recuperado de: <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>

- Oldroyd, G.**, y **Dixon, R.** (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19–24.
- Peremarti, A.**, Twyman, R., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Salbaza, M., ... Capell, T. (2010). Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Molecular Biology*, 73 (4), 363-378.
- Pollitt, A.**, y **Insall, R.** (2009). WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science*, 122 (15), 2575–2578.
- Porto, S.**, Pinheiro, P., Batista, L., Dos Santos, C., De Albuquerque Melo Filho, P., y De Lima, M. (2014). Plant promoters: An approach of structure and function. *Molecular Biotechnology*, 56 (1), 38 -49.
- Rudge, T.**, Brown, J., Federici, F., Dalchau, N., Phillips, A., Ajioka, J., y Haseloff., J. (2015). Characterization of intrinsic properties of promoters. *ACS Synthetic Biology*, 5 (1), 89-98.
- Timmers, A.** (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy*, 231 (2), 247–256.
- Tirichine, L.**, Sandal, N., Madsen, L., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., ... Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, 315 (5808), 104-107.
- Vermeer, J.**, von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, K., Maizel, A., y Geldner, N. (2014). A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 343 (6167), 178 – 183.
- Vitha, S.**, Beneš, K., Phillips, P., y Gartland, A. (1995). Histochemical *GUS* analysis. In *Agrobacterium* protocols, A. Gartland y R. Davey, eds (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 185- 193.

- Vitousek, P., Aber, J., Howarth, R., Likens, G., Matson, P., Schindler, D., Schlesinger, W., y Tilman, D. (1997).** Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications*, 7 (3), 737–750.
- Wagner, S. (2011).** Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*, 3 (10), 15.
- Watts, D., Runion, G., Smith- Nannenga, K., y Torbert, H. (2015).** Impacts of enhanced-efficiency nitrogen fertilizers on greenhouse gas emissions in a coastal plain soil under cotton. *Journal of Environment Quality*, 44 (6), 1699.
- Yang, Z. (2002).** Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 14 Suppl, 375-388.
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., ...Stougaard, J. (2009).** Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *The Plan Cell Journal*, 21 (1), 267 - 284.