

¿Es Fundamental la Presencia del PI3P para la Formación del Nódulo en Plantas de Frijol?

Javier Heredia Bracamontes, Alan Marín Mariscal, Oscar Martínez Rodríguez, Paulina Rocha Cebrián, Luis Alberto Rosette Iturbe

Estrella del Norte #6 Col. Rancho Tetela CP. 62160, (777)3124277
colegio@marymount.edu.mx

Palabras Clave: PI3P, *Rhizobium etli*, simbiosis.

Resumen

Nuestro proyecto consistió en determinar el papel del fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P) en el proceso de la simbiosis que se da entre la bacteria *Rhizobium etli* y la planta de frijol. Parea que dicha simbiosis de lleve a cabo, en donde el frijol proporciona cadenas de carbono y el *Rhizobium* proporciona nitrógeno, se crea un órgano llamado nódulo donde se establece el *Rhizobium* como bacteroide. En el proceso de simbiosis participan una infinidad de agentes y uno de los más importantes es el PI3P, fosfolípido que se encuentra en la membrana de las células. Para determinar el papel del PI3P, utilizamos una proteína de fusión con un dominio denominado FYVE y la proteína amarillo fluorescente (YFP). El dominio FYVE es una parte de una proteína que tiene gran afinidad por unirse al PI3P y por lo tanto lo utilizamos como sonda de rastreo para el fosfolípido. De nuestro proyecto se pudo concluir que el PI3P es de vital importancia en la formación del nódulo, ya que en su ausencia, probablemente la fusión de membranas no se lleva a cabo correctamente y el proceso de infección de las raíces con *Rhizobium* se ve afectado.

Introducción

Generalmente cuando una planta es infectada por una bacteria, se defiende activando su sistema inmune innato, matando a las células infectadas. Sin embargo, esto no sucede cuando microorganismos como *Rhizobium etli* infectan al frijol ya que en este caso ambos organismos se benefician. El frijol atrae a las bacterias por medio de la liberación de compuestos químicos cuando necesita nitrógeno y éstas se encargan de formar nódulos,

que son órganos fijadores de nitrógeno en la raíz. Es necesario que ocurra un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta para la formación de un nódulo y para que este sea efectivo en la fijación de nitrógeno (Fig.1).

El *Rhizobium* entra a la planta a través de los pelos radiculares, formando una estructura llamada hilo de infección, e infecta intracelularmente a las células corticales de la raíz. Una vez dentro de la célula, las bacterias se diferencian en bacteroides y comienza el proceso de la fijación

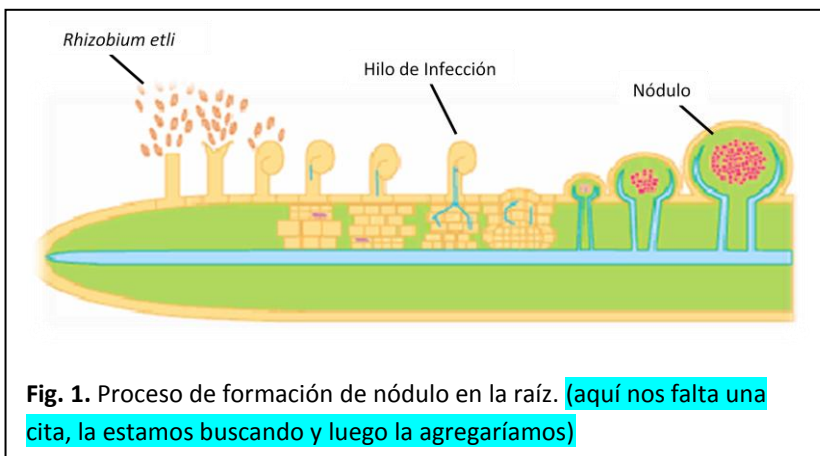


Fig. 1. Proceso de formación de nódulo en la raíz. (aquí nos falta una cita, la estamos buscando y luego la agregaríamos)

de nitrógeno (Giles *et al.*, 2008). Durante eventos iniciales de la interacción, se expresan los genes de las nodulinas tempranas de la planta, que participan principalmente en el desarrollo o formación del nódulo (Oldroyd *et al.*, 2005).

Cuando una planta es infectada por microorganismos, éstos se pueden introducir a las células de la planta por endocitosis¹, desencadenando un proceso de señalización para dirigir al endosoma² hacia la vacuola para ser degradado (Fig. 2). En el proceso de endocitosis está involucrada una enzima denominada fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K), responsable de la formación del fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P), el cual está unido a la membrana celular que cubre al endosoma. El PI3P juega un papel crucial en la fusión de membranas.

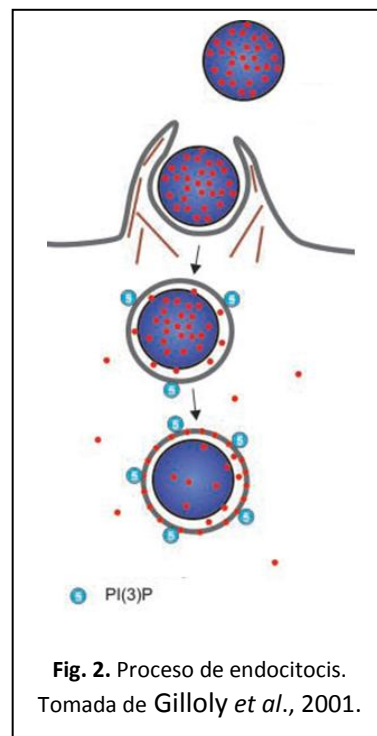


Fig. 2. Proceso de endocitosis. Tomada de Gilloly *et al.*, 2001.

Este fosfolípido es reconocido por proteínas que contienen un dominio llamado FYVE, que se ha encontrado en procesos de señalización (Gilloly *et al.*, 2001). Lo que se ha encontrado en la literatura en otra leguminosa es que la inhibición de PI3K, (o sea la carencia de PI3P) suprime la endocitosis de membrana, reduce el “encorvamiento” de los pelos radiculares de la raíz y en consecuencia se ve

¹ Proceso celular: proceso por el que la célula introduce en su interior moléculas grandes o partículas, englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse e incorporarse al citoplasma.

² Orgánulo de las células delimitado por la membrana celular, que transporta material incorporado por medio de endocitosis. También conocido como vesícula endocítica o simbiosoma (una vez que establece simbiosis).

afectada la infección por *Rhizobium* (Peleg-Grossman *et al.*, 2007).

En este proyecto demostramos que el PI3P participa en el proceso de simbiosis³ entre la planta de frijol y *R. etli*. Para ello se utilizó un plásmido pGreen-35S-YFP-2xFYVE, que contiene la proteína de fusión Yellow Fluorescent Protein (YFP) que lleva el dominio FYVE dos veces, el cual servirá como sonda de rastreo para PI3P (Vermeer *et al.*, 2006). Se transformó *A. rhizogenes* K599⁴ con el plásmido mencionado. Los nodos cotiledonares de la planta fueron infectados con *A. rhizogenes* para generar las raíces transgénicas y para introducir la información genética del plásmido. Estas raíces a su vez se inocularon con *Rhizobium etli* que lleva a la proteína roja fluorescente-*Rhizobium etli* (DsRed). Esto nos permitió observar el camino de la bacteria hacia la célula dentro de las raíces, así como su estado endosomal, empleando un microscopio confocal.

Hipótesis

La ausencia del fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P) en la membrana celular no permitirá que la simbiosis entre *R. etli* y *P. vulgaris* se establezca favorablemente, debido a que al no estar presente el PI3P la fusión de membranas no se llevará a cabo para que se cree el hilo de infección.

Objetivos

Generales:

Determinar el papel del PI3P en la simbiosis de *Rhizobium etli* con *Phaseolus vulgaris*.

Específico:

Expresar un dominio que se une al PI3P (FYVE) fusionado a la proteína YFP en *Phaseolus vulgaris*, para visualizar la presencia de éste en las membranas de raíces sin inocular y las inoculadas con *Rhizobium etli*.

Materiales y Metodología

- Germinación de semilla de frijol
 - 60 semillas de frijol
 - Charola con 3 servitoallas estéril
 - 2 litros de agua estéril
 - Probetas estériles
 - Pinzas
 - Microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta conectado a un Axiovert

- Preparación de inóculo

³ Interacción biológica entre dos o más organismos de distintas especies en donde hay un beneficio mutuo.

⁴ Se usará la cepa de *A. rhizogenes* K599 ya que ha sido la más eficiente (del 70 al 90 % de efectividad) para inducir raíces peludas transgénicas a *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006).

- 100 ml de medio LB sólido⁵ para 5 cajas de petri estériles
- Stock de antibiótico (kanamicina)
- Infección de plántulas con *Agrobacterium rhizogenes* K599
 - EtOH industrial
 - Varilla de vidrio
 - Puntas y tubos estériles
 - H₂O estéril
 - Jeringas desechables
 - Macetas pequeñas con vermiculita estéril
- Hidroponia
 - 1caja de plástico de 15 litros.
 - 1 charola de plástico
 - 1 burbujeador
 - 6 metros de manguera
 - 1 bomba de agua
 - Pinzas de ropa
 - Tapas de plástico
 - Esponjas en cuadros chicos.

Se utilizó el método de producción de raíces transgénicas de frijol descrito por Estrada-Navarrete, et al (2007).

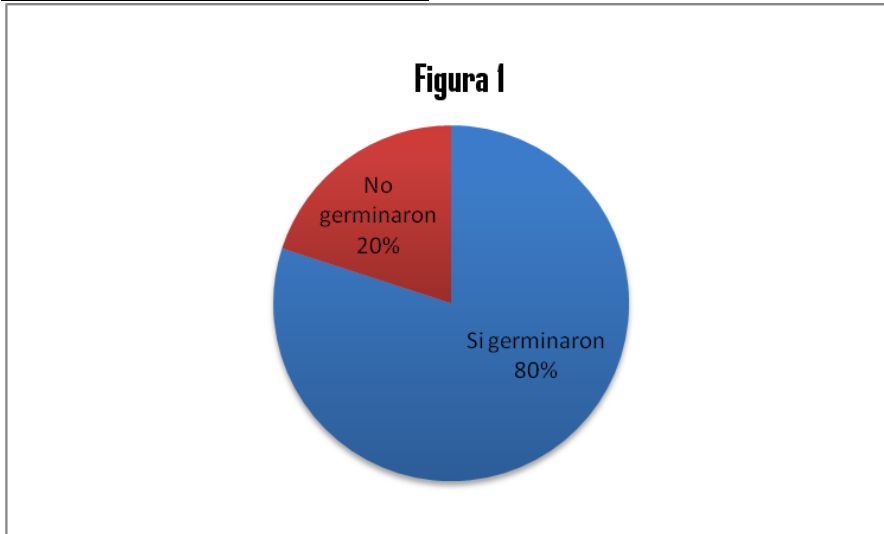
- Germinación de semilla de frijol
Desinfectamos 60 semillas de frijol, escogiendo las que estaban en mejores condiciones. Las lavamos con H₂O estéril 4 veces y una vez con EtOH industrial por un minuto, repetimos el lavado con H₂O estéril y finalmente las dejamos en una solución de cloro al 20 % por 5 minutos. Ya desinfectadas las semillas, las colocamos en charolas sobre servitoallas humedecidas con agua destilada estéril. Las cubrimos con papel aluminio y las pusimos a incubar en un cuarto de germinación 2 días, a 25° C, alternando 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El 3^{er} día pasamos los germinados a macetas, las regamos y las regresamos al cuarto de germinación.
- Preparación del inóculo
Tres días después de la siembra de las semillas estriamos las cepas de *Agrobacterium* en cajas con medio LB y kanamicina y las incubamos a 30° C, por 24 horas. Estriamos una caja con *A. rhizogenes* K599 sin antibiótico (como control) y otras 4 colonias de la cepa de *A. rhizogenes* K599 con el plásmido pGreen llamadas FYVE 1, FYVE 2, FYVE 3 y FYVE 4 con kanamicina.

⁵ Contiene por cada litro de medio: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, con pH 7,5 (ajustado con NaOH).

- Infeción de plántulas con *Agrobacterium rhizogenes* K599
Recolectamos el cultivo de *A. rhizogenes* añadiendo 1 ml de agua estéril a la caja de Petri, y mezclando con una varilla de vidrio, el líquido obtenido lo recogimos con una jeringa. Al 5º día de la germinación de las semillas, inoculamos 25 plantas mediante una inyección de *A. rhizogenes* (con el plásmido pGreen) y 15 más sin el plásmido para tener un control, directamente en los nodos del cotiledón con una jeringa con 1 ó 2 gotas del inóculo en la herida. Inmediatamente después las regamos y cubrimos con una tapa para mantener la humedad. Una semana después de la inoculación, las plantas infectadas con las cepas de interés empezaron a mostrar callos de raíz en los sitios de la herida.
- Transferencia de plantas inoculadas a hidroponía
Preparamos un inóculo con *R. etli* (con la información genética que codifica para la proteína roja fluorescente) en un matraz con 100 ml de medio PY, ácido nalidíxico, CaCl₂ y cloramfenicol, lo inoculamos con *Rhizobium* y lo incubamos con agitación durante toda la noche a 30 °C. Posteriormente centrifugamos el cultivo 5 min a 6,000 rpm y descartamos el sobrenadante; lavamos las células con 100 ml de MgSO₄ 10mM estéril y finalmente las resuspendimos en 100 ml de MgSO₄ 10 mM. En los 12 a 15 días posteriores a la inoculación con *A. rhizogenes*, las plantas infectadas presentaron “hairy-roots”. Después de éste tiempo, cortamos aproximadamente 1 cm debajo de la raíz transgénica de las plantas de cada tratamiento; envolvimos el tallo con una esponja y las trasparamos a charolas con agujeros poniendo en cada agujero una planta para que apenas toque el agua con los nutrientes de la hidroponía. Posteriormente se pone en el fondo del contenedor un burbujeador conectado con una manguera de plástico a una bomba de aire. Se acomodan las charolas en contenedores de plástico y se cubren con tapas transparentes para conservar la humedad. El agua de la hidroponía contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta, un pH controlado, y además la inoculación con *Rhizobium* para la formación de los nódulos.
- Cambio de la Solución de hidroponía (cada 8 días)
Lavamos una charola con etanol, agregamos 4 litros de agua esterilizada y después añadimos los nutrientes para la planta. Agregamos otros 4 litros de agua esterilizada resultando un total de 8 litros. Añadimos 500 microlitros de MES (solución reguladora de pH). Cambiamos el burbujeador y la charola con las plantas a la nueva caja con mucho cuidado.
- Microscopia Confocal
 - Con ayuda de una especialista en microscopía tomamos muestras a diferentes tiempos del desarrollo de los nódulos en las raíces inoculadas con *Rhizobium etli* (que expresa la construcción DsRed). Se realizaron micro-cortes con micro pinzas y tijeras y observamos éstas muestras en el Microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta conectado a un Axiovert

Resultados y Discusión

Germinación de Semillas de frijol



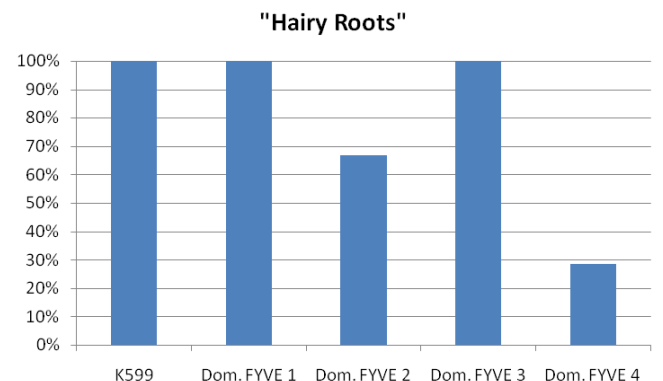
- De las 60 semillas que se sembraron sólo 12 no germinaron (Figura 1). Esto depende de varios factores como son: la calidad de la semilla, el posicionamiento de la semilla en la charola, el espacio de crecimiento y la cantidad de agua disponible para cada semilla. Sin embargo la mayoría si germinaron aunque algunas presentaron raíces más grandes que las otras. De las 48 semillas que se pasaron a maceteas, después del 3^{er} día de germinación, 40 crecieron.

- Crecimiento de *A. rhizogenes*

Todas las cepas de *A. rhizogenes* que contenían al plásmido pGreen crecieron uniformemente, a excepción de la cepa FYVE 1. Esto puede ser debido a que no sembramos la cantidad suficiente de bacteria o que ésta cepa crece más lentamente.

- Inoculación de plántulas con *Agrobacterium rhizogenes*

De las 25 plantas inoculadas con el *A. rhizogenes* que contenía al plásmido pGreen, 17 presentaron "hairy roots" y del control (K599) se obtuvo un 100 % de plantas con raíces transgénicas (Figura. 1). La diferencia del crecimiento de las raíces puede ser por diferentes variables. Por ejemplo, la cantidad de bacteria con la que se inoculó, la imprecisión de nosotros al inyectar a las plantas o la cantidad de humedad que tiene cada planta.



- Inoculación de raíces con *R. etli*

De las plantas que se pasaron a hidroponía un 85 % presentaron nódulos en las raíces.

- Microscopia Confocal

Después de una semana de la inoculación con *R. etli*, se tomaron muestras de nódulos en fresco en diferentes etapas de su desarrollo y se observaron en el microscopio confocal. Se obtuvieron las siguientes fotografías (Figuras 3, 4, 5 y 6).

Se observa (en rojo) el *Rhizobium etli* y en verde la proteína de fusión YFP-FYVE unido al PI3P

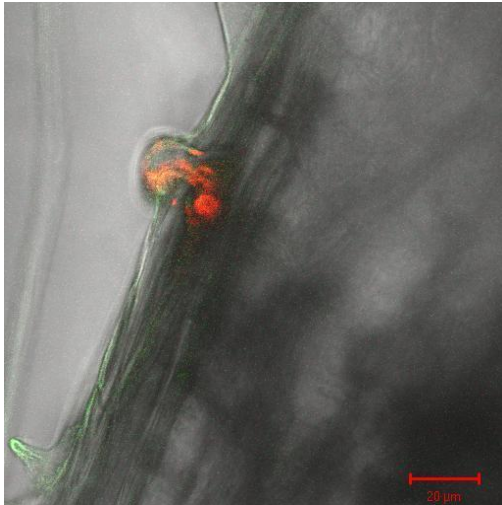


Fig. 3 En esta fotografía se puede observar un hilo de infección en desarrollo. En este caso la ausencia de PI3P no permitió un desarrollo normal del hilo ya que la fusión de membranas no se llevó a cabo correctamente.

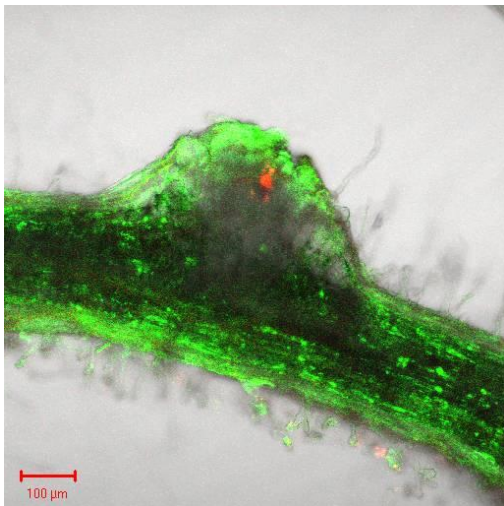


Fig. 4 En esta fotografía se puede observar un primordio de nódulo, es decir un nódulo en proceso de formación. Normalmente la bacteria debería de estar distribuida en toda la parte oscura del órgano, sin embargo debido a la ausencia de PI3P, se detiene el proceso de infección durante la formación del hilo de infección.

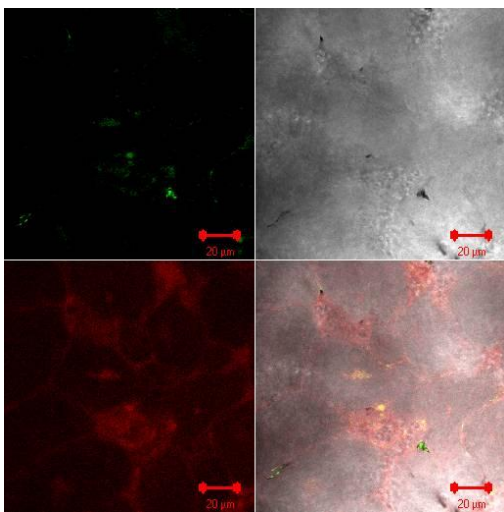


Fig. 5 En esta fotografía se aprecia un nódulo de 15 días infectado con el control K599. El rojo son células infectada con *Rhizobium* y lo verde que se aprecia es autofluorescencia de la planta. Aquí se puede observar que cuando no hay dominio FYVE secuestrando al PI3P, *R. etli* se distribuye de una manera uniforme en el nódulo, en contraste con lo observado en la Fig. 6.

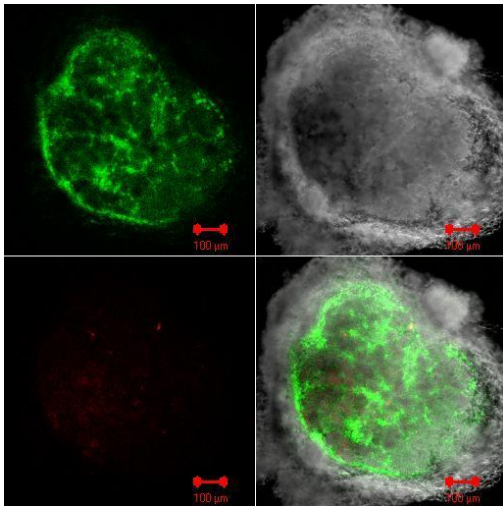


Fig. 6 En esta fotografía se observa un nódulo de 15 días infectado con la cepa de *A. rhizogenes* con el dominio FYVE-3 (en verde). Aquí se puede observar claramente, en comparación con la Fig. 5, como *R. etli* se concentra en lugares donde no hay dominio FYVE atrapando al PI3P. Esto se cree que se debe a que la bacteria busca sitios en donde el PI3P no se encuentra atrapado por el dominio.

Conclusión

Por medio de las imágenes obtenidas de la microscopía confocal, logramos demostrar que el PI3P es un fosfolípido de vital importancia en la formación del nódulo en las raíces de *Phaseolus vulgaris*, ya que en su ausencia la fusión de membranas y por lo tanto el proceso de infección se ven afectados. Para formar el hilo de infección por donde viaja la bacteria hasta las células de la planta, se necesita fusión de membranas, sin embargo a la falta de PI3P este proceso no se lleva a cabo correctamente y se forman, en ciertos casos, “nódulos vacíos” (con ausencia de *Rhizobium*) (Fig. 4 y 6). En otras situaciones aunque la bacteria llegaba al nódulo, esta se veía forzada a concentrarse en lugares donde no había PI3P atrapado por el dominio FYVE, en busca del fosfolípido (Fig. 6) en comparación con el control en donde se tenía una distribución uniforme de la bacteria (Fig. 5). Con nuestro proyecto logramos fundar las bases para un proyecto de investigación que el laboratorio del Dr. Federico Sánchez va a continuar y a refinar.

Agradecimientos

Queremos agradecer a nuestros asesores el Dr. Federico Sánchez Rodríguez, la M.B. Georgina Estrada-Navarrete y también a la asistente de Microscopía Confocal la QFB. Xochitl Alvarado-Affantranger por todo su apoyo y ayuda para poder llevar a cabo este proyecto en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Así mismo, agradecemos a nuestro profesor, el Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Bibliografía

Estrada-Navarrete G., Alvarado X., Olivares J., Díaz C., Santana O., Murillo E., Guillen G., Sánchez N., Acosta J., Quinto C., Li X., Gresshoff P. Sánchez F., "Agrobacterium rhizogenes transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1385-1393, 2006.

Estrada-Navarrete G., Sánchez F., Guillén G., Olivares J., Díaz C. Alvarado X., "Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*". *Nature Protocols*: 2, (7); 1819-1824, 2007.

Giles E., Oldroyd G., Downie A. "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes". *The Annual Review of Plant Biology*, 59: 519-546, 2008.

Gillooly D.J., Simonsen A., y Stenmark H. "Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins". *Biochemistry Journal*, 355, 249-258, 2001.

Gillooly D.J., Simonsen A., Stenmark H. "Phosphoinositides and phagocytosis". *The Journal of Cell Biology*, 155, (1): 15-17, 2001.

Oldroyd, G., Harrison M., Udvardi M. "Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses". *Plant Physiology*, 137: 1205-1210, 2005.

Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. "Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species". *Journal of Experimental Botany*, 58, (7): 1637-1649, 2007.

Vermeer J.E.M., Van Leeuwen W., Tobeña-Santamaría R., Laxalt A.M., Jones D.R., Divecha N., Gadella T.W.J., Munnik T. "Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells". *The Plant Journal*, 47: 687-700, 2006.

