PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DE ATG9 DURANTE LA INTERACCIÓN SIMBIÓTICA ENTRE RHIZOBIUM Y FRIJOL

Elsa-Herminia Quezada [1], Manoj-Kumar Arthikala [1], Kalpana Nanjareddy [1]
[*1] Ciencias Agrogenómicas, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), León, C.P. 37684, Guanajuato, Mexico. Autor / Ponente: kalpana@enes.unam.mx / qrelsa@gmail.com ; Tel. 01(477) 194 08 00 Ext.43462

Palabras clave: autofagia, simbiosis, fijación de nitrógeno.

Introducción. La autofagia es un proceso de degradación de las células eucariontes que juega un papel importante durante la inanición para mantener la homeostasis. La regulación del proceso se lleva a cabo por los genes de AuTofaGia (Atg) para formar una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma que se fusiona con los lisosomas o vacuolas (en plantas) (1). Este proceso ha sido poco estudiado en las plantas pero cobra relevancia porque recientemente se ha demostrado ser esencial durante la simbiosis del Frijol y *Rhizobium (2)*. Durante la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno como el frijol y *Rhizobium* se forman nódulos, que son estructuras que permiten la reducción de nitrógeno a amonio. Esta reacción es de suma relevancia ecológica y agronómica por lo que es importante entender la relación entre leguminosas y bacterias fijadoras. En este proyecto analizamos la expresión de los genes de autofagia y nos enfocamos en el gen Atg9 con el objetivo de entender la complejidad de la relación entre Frijol y *Rhizobium tropici* durante la nodulación.

Metodología. El material biológico utilizado fue *Phaseolus vulgaris* variedad *Negro Jamapa* y *Rhizobium tropici* CIAT899. Para las anotaciones ontológica se usó GO consortium tools, el análisis de promotor Plant RegMap y se utilizó la herramienta de bar.utoronto para ubicar la expresión de los genes de autofagia. Para el análisis de promotor se identificó la secuencia del promotor con el genoma de *Phaseolus vulgaris* V.2.1 de Phytozome, se aisló son oligonucleótidos con 2000pb rio arriba del codón de inicio del gen ATG9. Se utilizó el vector pENTER/TOPO y el vector destino pBGWFS7.0 para obtener pBGWFS7.0/pAtg9:GUS-GFP y transformar con *A. rhizogenes* K599 las plantas de frijol e inocular CIAT899 (3). Finalmente se analizaron etapas tempranas, maduras y senescentes con la tinción de GUS en el microscopio Leica DM5000 y M210F.

Resultados. A partir de los genes de autofagia en *Arabidopsis* (atAtg) se corroboró con su ontología que los procesos biológicos principales son la autofagia, los procesos catabólicos, la respuesta a niveles nutricionales, la respuesta a inanición y en particular de nitrógeno. Con las secuencias de atAtg se obtuvieron los patrones de expresión diferenciales. En la raíz principalmente están los genes Atg9, Atg2 y Atg11. La mayoría de los atAtg se concentra en la zona de elongación y maduración pero Atg9 y Atg8 son los principales en la zona meristemática. Una vez obtenidos los genes de autofagia en frijol (pvAtg) se hizo la búsqueda de los factores de transcripción y encontramos que los principales sitios de factores de transcripción en los pvAtg son DOF, MYB y ERF. El factor de transcripción DOF participa en el crecimiento y desarrollo del frijol (4) y MYB participa en la elongación de la raíz, y la inanición de fosfato (5). Después de los análisis bioinformáticos se analizó con detalle pvATG9 con la construcción para analizar el promotor de pvATG9 y se encontró expresión en el tejido vascular de nódulos de todas las etapas de desarrollo.

Sitios de factores de transcripción de pvATG.

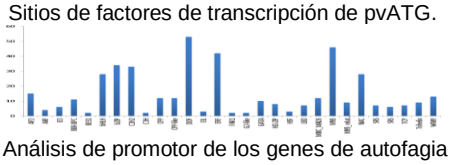

Tabla 1. Análisis de promotor de los genes de autofagia en frijol.

Expresión del gen ATG9 en nódulos maduros de frijol

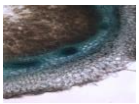

Fig. 1. La expresión de ATG9 con la tinción de GUS se encontró en el tejido vascular de nódulos maduros de frijol inoculado con R.tropici.

Conclusiones. Los atAtg se relacionan con los niveles nutricionales principalmente los niveles e inanición de nitrógeno. La expresión de los atAtg es diferencial en los órganos. Atg9 es el gen que más se expresa en raíz de 10 días y en la zona meristemática. Los factores de transcripción DOR y MYB son los más abundantes en los pvATG. La expresión de Atg9 en frijol inoculado con *Rhizbium tropici* CIAT899 está en el tejido vascular durante todo el desarrollo del nódulo por lo que la autofagia está desempeñando su función durante de la nodulación.

Agradecimientos. DGAPA/PAPIIT-UNAM no. IA207219 a M.-K.A, IN211218 a K.N. , No. De Beca 409344/289810 del CONACYT a E.Q

1 .Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2002). *Eukaryotic cell*, *1*(1), 11-21.
2 .Estrada-Navarrete, G et al. (2016). *The Plant Cell*, *28*(9), 2326-2341.
3.Nanjareddy, K., et al. (2017). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), e56140.
4 .Ito, T et al. (2017) . *Am. J. Plant Sci*, *8*, 3233-3257.
5 .Valdez-López, O (2008). *Plant, Cell & Environment*, *31*(12), 1834-1843.