

“¿Es fundamental la presencia del PI3P para la degradación del endosoma en plantas de frijol?”

Autores: Javier Heredia, Alan Marín, Oscar Martínez, Paulina Rocha y Luis Alberto Rosette.

Profesor: Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Asesores: Dr. Federico Sánchez Rodríguez y M.B. Georgina Estrada Navarrete

COLEGIO MARYMOUNT

ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROYECTO CON APOYO EXTERNO

MARCO TEÓRICO:

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 la infección le otorga beneficios a la planta (5). El frijol atrae a la bacteria por medio de la liberación de compuestos químicos cuando necesita nitrógeno y éstas se encargan de formar nódulos fijadores de nitrógeno en la raíz. Es necesario que ocurra un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta (proceso conocido como simbiosis) para la formación de un nódulo y que éste sea efectivo en la fijación de nitrógeno.

Cuando una planta es infectada por microorganismos como *R. etli*, éstos se introducen a las células de la planta por endocitosis¹, desencadenando un proceso de señalización para dirigir al endosoma² hacia la vacuola para ser degradado. En el proceso de degradación está involucrada una molécula denominada fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P) la cual está unida a la membrana que cubre al endosoma. El PI3P es reconocido por proteínas que contienen un dominio llamado FYVE que se han encontrado en procesos de señalización (4). Una vez que el dominio FYVE reconoce al PI3P, se activa la degradación de la vesícula por fusión con la vacuola. Cuando *R. etli* infecta a la planta, los niveles de PI3P disminuyen (4) lo que indica que la señal para eliminar el endosoma es probablemente desactivada.

ANTECEDENTES:

Aunque se han realizado muchas investigaciones con respecto al *Agrobacterium rhizogenes*, ninguna de ellas se ha hecho para determinar la relación entre la bacteria y el PI3P. En artículos anteriores, se pueden identificar diferentes variables que se utilizarán en esta investigación. Investigadores han explorado cómo se puede optimizar la transformación genética del *Agrobacterium rhizogenes*, específicamente de la zanahoria (2). Otros investigadores experimentaron con la transformación de raíces en las plantas mediante el *Agrobacterium rhizogenes*; observaron cómo las plantas se convirtieron en lo

¹ Proceso celular, 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.

que se llama “Plantas Compuestas”, que consisten en raíces transgénicas peludas que se adhieren a los tallos y las hojas que no han sido transformadas (3).

OBJETIVO:

Determinar si el PI3P está relacionado con el proceso de desactivación y-o inhibición de la degradación de *Rhizobium etli* como endosoma, en células de frijol infectadas por ésta bacteria.

METODOLGÍA

Lugar: Laboratorio del Dr. Federico Sánchez, Departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Procedimiento:

Para la germinación de las semillas, se escogen las de mejor calidad, se lavan con H₂O estéril 4 veces y una vez con EtOH industrial por un minuto, se repite el lavado con H₂O estéril y finalmente se dejan en una solución de cloro al 20% por 5 minutos. Ya desinfectadas las semillas, se colocan en charolas sobre servitoallas humedecidas con agua-distilada-estéril. Se cubren con papel aluminio y se incuban en un cuarto de germinación 2 días, a temperatura entre 22 y 26° C alternando 16 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El 3er día los germinados se pasan a macetas, se riegan y se regresan al cuarto de germinación.

Se prepara un inóculo de *A. rhizogenes* (contiene la información genética que codifica para el dominio FYVE fusionado a la proteína verde fluorescente) en cajas de Petri con medio LB³, se incuban a 30°C de 12-24 horas. Se colecta el cultivo añadiendo 1 ml de agua estéril a la caja de Petri, con una varilla de vidrio, el líquido obtenido se recoge con una jeringa. Al 5° día de la germinación de las semillas, las plantas se inoculan mediante una inyección del *A. rhizogenes* directamente en los nodos del cotiledón con una jeringa con 1 ó 2 gotas del inóculo en la herida. Es indispensable que inmediatamente se rieguen y se cubran con una tapa para mantener la humedad.

Se prepara un inóculo con *R. etli* (con la información genética que codifica para la proteína roja fluorescente) en un matraz con 100 ml de medio con *Rhizobium* y se incuban con agitación durante toda la noche a 30 °C. En los 12-15 días posteriores a la inoculación con *A. rhizogenes*, las plantas infectadas presentan “hairy-roots” (raíces peludas). Después de éste tiempo, se corta aproximadamente 1 cm debajo de la raíz primaria de las plantas de cada tratamiento; se transfieren a las macetas grandes de plástico que contienen vermiculita y se inoculan esparciendo el *R. etli*.

Posteriormente se harán micro-cortes de las raíces de la planta con un micro-tomo y se observaran al microscopio confocal para determinar la presencia del PI3P.

³ Extracto de levadura 10g/l, bacto-triptona 5g/l, NaCl 10g/l, agar 2%.

RESULTADOS:

El proyecto actualmente se encuentra en desarrollo, se espera determinar que cuando *R. etli* infecta la planta de frijol, es capaz disminuir los niveles de PI3P ya sea por la inhibición de la enzima que lo produce (PI-kinasa) (1) o porque lo enmascara por algún mecanismo desconocido, evitando así ser reconocido por el dominio FYVE de proteínas involucradas en procesos de señalización para ser degradado como endosoma.

CONCLUSIONES:

El experimento se encuentra en desarrollo, tentativamente se puede concluir que el PI3P es una molécula que al disminuir sus niveles en las plantas de frijol en presencia de *R. etli*, permite que éste permanezca dentro de las células y por lo tanto de lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en la raíz.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., “Some G Proteins Activate An Inositol Phospholipid Signaling Pathway”, *Molecular Biology of the Cell*, Editorial Garland Science, 5ª edición, p. 909-912, 2008. ISBN: 978-0-8153-4105-5.
- (2) Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L., “Optimización de la Transformación Genética con *Agrobacterium rhizogenes*.” 2003, Citado el 16 de Febrero de 2009, de MAG: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v27n01_019.pdf
- (3) Chabaud, M., Boisson-Dernier, A., Zhang, J., Taylor, C. G., Yu, O., & Barker, D. G., *Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation*. 2006, Citado el 16 de Febreo de 2009, de Noble: <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/AgrobacteriumRhizogenes.pdf>
- (4) Gilloody D.J., Simonsen A., and Stenmark H., “Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins”, *Biochem. J.*, 355, 249-258, 2001.
- (5) Sánchez F., Estrada G., Guillén G., Olivares J., Díaz C. y Alvarado X., “La transformación genética y genómica del frijol”, *Una ventana al quehacer científico*, Editorial Impresora Apolo, Compiladores: Agustín López Munguía y Francisco Rebolledo, p. 281-290, 2008. ISBN:978-970-32-4658-8