



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

## INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

EFFECTO DE LA BACTERIA *Arthrobacter agilis* UMCV2 EN LA  
EXPRESIÓN ÓRGANO ESPECÍFICA DE LOS GENES *FRO* Y DE  
GENES MARCADORES DE LAS VÍAS DE RESISTENCIA  
SISTÉMICA EN *Medicago truncatula*

### TESIS

Que presenta:

BIOL. VICENTE MONTEJANO RAMÍREZ

Como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Asesor: D.C. en la especialidad de Biotecnología  
de Plantas, EDUARDO VALENCIA CANTERO

Morelia, Mich. Noviembre del 2016



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UMSNH

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de “Ecología Microbiana” del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo el asesoramiento del D.C. Eduardo Valencia Cantero; con el apoyo de la beca No. 332814 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## AGRADECIMIENTOS

Con el paso del tiempo, nos damos cuenta que el transcurrir de la vida, no es un fenómeno aislado: es obligatorio establecer relaciones sociales para progresar tanto personal, como profesionalmente. Gracias al establecimiento de estas relaciones sociales (tanto benéficas como perjudiciales) aprendemos, mejoramos y nos fortalecemos. Consecuentemente, en todo proyecto que decidamos emprender, hay personas dispuestas a apoyarnos.

Mis padres: **Imelda Ramírez Madrigal** y **Carlos Montejano Melgoza**, son de esas personas con las cuales, cada momento es benéfico y gratificante: siempre dispuestos a apoyarme, económica y emocionalmente. Es un gusto y una fortuna seguirlos teniendo a mi lado; impulsándome, inspirándome y animándome a ser mejor. A pesar de que están lejos, el sólo hecho de escucharlos a distancia y visitarlos en temporadas vacacionales, refuerza el gran amor que siento por ellos. Gracias por recordarme que aún tengo hombros sobre los cuales llorar y que si en algún momento, me derrumbo, ustedes seguirán de pie para mí. Adicional a mis padres, cuento con la presencia de hermanos extraordinarios: **Antonio Montejano Ramírez**, **Ma. Sandra Montejano Ramírez** y **Rosalía Salgado Ramírez**; ellos sin duda me sacarían de cualquier aprieto sin importarles lo que éste conlleve.

Dentro de las relaciones sociales, indudablemente, se establecen conexiones emocionales. En mi caso, es un orgullo tener a una mujer excelente a mi lado; **Alma Alejandra Hernández Esquivel**. Ella se ha convertido en mi mejor confidente: cuando estoy a punto de dejar de luchar, su presencia me recuerda que el caminar de su sombra siempre irá a la par con el de la mía; que siempre tendré un abrazo de apoyo y unas palabras de motivación. No hace falta recordarte que ni siquiera imagino estar sin ti. Es un placer el haber consagrado mi existencia a la tuya. Te amo, gracias por hacer posible la existencia de nuestro principal motivo de superación: **Athena Montejano Hernández**, la cual no necesita realizar acción alguna para lograr tener mi amor en la forma más pura que existe; pues la amé de

manera ilógica y sin motivo desde el momento en que la vi. Todos mis actos, todos mis logros, todas las ganas de levantarme después de cada derrota, todas las fuerzas para seguir aun cuando estoy desplomado; se deben a que existes tú en nuestras vidas, para recordarnos que todo vale la pena cuando nos muestras tu felicidad, tu sonrisa y tu amor.

Una vez que te alejas de todo lo que te recuerda a tu familia (tanto a la genética como a la establecida); existen amigos sin los cuales el éxito sería inalcanzable: **M.C Idolina Flores Cortez**; gracias por siempre estar dispuesta a apoyar en todo proceso experimental, por escucharme e instruirme que la ciencia está llena de fracasos que no nos deben derrumbar, sino motivar a indagar y corregir los errores. **Biol. Christian Hernández Soberano**; gracias por explicarme cualquier cuestión teórica o experimental en la me estancara, por dedicarme tu tiempo con métodos experimentales que tardaban todo el día. **M.C Ramiro Martínez Cámara**; gracias por apoyarme en el diseño de oligos y ayudar en cada procedimiento *in silico* requerido para el proyecto. **M.C Cristina Mariana Prieto Barajas**; contigo es tan fácil hablar sobre cualquier cosa, gracias por ofrecer esa calidez. **D.C Erasto Hernández Calderón**; gracias por enseñarme el método de extracción de RNA y por tu apoyo en los experimentos de qPCR. **M.C. Ernesto Vázquez Chimalhua**; gracias por permitirme hablar sobre cualquier curiosidad científica contigo. Gracias a **Kirán, Kassandra y Martha** que, aunque su llegada al grupo de trabajo es reciente, han demostrado ser elementos valiosos, que queremos seguir conservando. Finalmente, doy las gracias al **D.C Eduardo Valencia Cantero**, por permitirme trabajar en su laboratorio, por darme la confianza para avanzar a mi ritmo y con mis tiempos, por siempre estar dispuesto a escuchar mis presentaciones y ayudarme a mejorarlas; por ser el elemento clave durante todo el desarrollo del presente proyecto.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
1.1 ABSTRACT .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. ANTECEDENTES .....	6
3.1 Características generales del hierro .....	6
3.2 Estrategia I para la absorción de hierro basada en reducción .....	7
3.2.1 Regulación de la expresión génica en plantas estrategia I .....	9
3.3 Mecanismo de las plantas estrategia II basado en quelación de hierro .....	11
3.3.1 Regulación química en las plantas estrategia II .....	13
3.4 Homeostasis del hierro .....	14
3.5 Estructura de la enzima FRO .....	17
3.5.1 Los genes <i>FRO</i> en plantas estrategia I .....	18
3.5.2 Genes <i>FRO</i> en plantas estrategia II .....	23
3.5.3 Localización intracelular de los genes <i>FRO</i> .....	24
3.6 Vía de señalización en respuesta a deficiencia de hierro .....	26
3.6.1 Fitohormonas involucradas en la señalización de hierro .....	27
3.6.2 Regulación de la respuesta a deficiencia de hierro por sacarosa .....	29
3.7 Rizobacterias que facilitan la absorción de hierro .....	30
3.7.1 Las rizobacterias modulan la resistencia al estrés salino .....	31
3.7.2 Los VOCs producidos por las PGPRs incrementan la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de hierro en la planta .....	32
3.7.3 Interacción entre los mecanismos de defensa inducidos por bacterias y el proceso de la toma de hierro en plantas .....	33
3.8 Características generales de <i>Medicago truncatula</i> .....	35
4. JUSTIFICACIÓN .....	38
5. HIPÓTESIS .....	39
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	39
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40

6.1	Escrutinio <i>in silico</i> de la expresión órgano específica de los genes <i>MtFRO</i> .....	40
6.2	Condiciones de crecimiento de las plantas de <i>Medicago truncatula</i> .....	40
6.3	Preparación del medio MS.....	41
6.4	Preparación de Hoagland .....	41
6.5	Inóculo de la bacteria <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	41
6.6	Inducción de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> .....	42
6.7	Cuantificación de clorofila.....	42
6.8	Extracción de RNA .....	42
6.9	Tratamiento con DNasa .....	43
6.10	Esterilización de la cámara de electroforesis .....	43
6.11	Cuantificación de RNA.....	43
6.12	Síntesis de cDNA usando Oligo DT .....	43
6.13	Reacción de PCR.....	44
6.14	Reacción de PCR en tiempo real.....	44
6.15	Análisis estadísticos .....	45
7.	RESULTADOS .....	46
7.1	Características generales de los genes <i>MtFRO</i> .....	46
7.1.1	Expresión órgano específica <i>in silico</i> de los genes <i>MtFRO</i> .....	47
7.1.2	Relaciones filogenéticas de los genes <i>MtFRO</i> .....	48
7.1.3	Localización subcelular de los genes <i>FRO</i> .....	49
7.2	Análisis de la expresión órgano específica de los genes <i>MtFRO</i> mediante PCR.....	50
7.3	Efecto de la bacteria <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 en la expresión órgano específica de los genes <i>FRO</i> de <i>Medicago truncatula</i> .....	57
8.	DISCUSIÓN .....	65
9.	CONCLUSIÓN .....	73
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estrategia I para la toma de hierro .....	8
Fig. 2. Estrategia II para la toma de hierro .....	12
Fig. 3. Estructura de la enzima FRO .....	17
Fig. 4. Localización subcelular de las enzimas FRO en <i>A. thaliana</i> .....	26
Fig. 5. Análisis <i>in silico</i> de la expresión órgano específica de los genes <i>MtFRO</i> .....	48
Fig. 6. Análisis filogenético de los genes <i>MtFRO</i> .....	49
Fig. 7. Contenido de clorofila en las plantas sometidas a diferentes tratamientos .....	51
Fig. 8. Prueba de evaluación de la calidad los oligos .....	52
Fig. 9. Expresión de los genes <i>FRO</i> en la raíz de <i>M. truncatula</i> .....	53
Fig. 10. Expresión de los genes <i>FRO</i> en el tallo de <i>M. truncatula</i> .....	54
Fig. 11. Expresión de los genes <i>FRO</i> en la hoja de <i>M. truncatula</i> .....	55
Fig. 12. Expresión de los genes <i>FRO</i> en la flor de <i>M. truncatula</i> .....	56
Fig. 13. Expresión de los genes <i>FRO</i> en la vaina de <i>M. truncatula</i> .....	56
Fig. 14. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> en la raíz de <i>M. truncatula</i> .....	58
Fig. 15. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> en el tallo de <i>M. truncatula</i> .....	59
Fig. 16. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> en la hoja de <i>M. truncatula</i> .....	60
Fig. 17. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> en la flor de <i>M. truncatula</i> .....	62
Fig. 18. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtFRO</i> en la vaina de <i>M. truncatula</i> .....	63
Fig. 19. Análisis por qPCR de la expresión de los genes <i>MtDEF 2.1</i> y <i>MtPR1</i> en la planta <i>M. truncatula</i> .....	64
Fig. 20. Modelo general del efecto de la deficiencia de hierro y la presencia de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la toma de hierro y las vías de resistencia en <i>M. truncatula</i> .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los genes <i>MtFRO</i> .....	46
Tabla 2. Localización subcelular de los genes <i>MtFRO</i> .....	50

## 1. RESUMEN

Para enfrentar la deficiencia de hierro, las plantas han desarrollado dos estrategias, una basada en la reducción previa del hierro antes de su transporte (estrategia I) y otra basada en su quelación (estrategia II). Los genes “*Ferric Reductase Oxidase*” (*FRO*), son clave en la estrategia I, debido a que codifican la enzima férrico quelato reductasa que reduce Fe (III) a Fe (II). En *Medicago truncatula* se han identificado seis genes *FRO*, sin embargo, se desconoce su expresión órgano específica. En el presente trabajo, demostramos que los genes *MtFRO1* y *MtFRO3* se expresan en raíz; el gen *MtFRO2* se expresa en hoja, flor y vaina; el gen *MtFRO4* se expresa en hoja y en raíz; el gen *MtFRO5* se expresa en raíz, tallo y hoja y el gen *MtFRO6* se expresa en raíz, flor y vaina. Adicionalmente se sabe que las bacterias “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria” (PGPRs) favorecen la disponibilidad de nutrientes para la planta y su absorción por parte de esta. Nuestros resultados demuestran que la bacteria PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2 induce la expresión de los genes *MtFRO* en los diferentes, siendo el efecto mayor en condiciones de deficiencia de hierro. Explicamos el fenómeno de inducción de los genes *MtFRO* mediante “Induced Systemic Tolerance” (IST); que favorece la resistencia al estrés abiótico y es desencadenada simultáneamente con “Induced Systemic Resistance” (ISR) y “Systemic Acquired Resistance” (SAR), debido a que se observó una inducción de los genes *MtDEF2.1* (relacionado a ISR) y *MtPR1* (relacionado a SAR) al inocular *A. agilis* UMCV2, siendo el efecto mayor en deficiencia de hierro.

**Palabras clave:** *Medicago truncatula*, *Arthrobacter agilis* UMCV2, *MtFRO*, defensa.

## 1.1 ABSTRACT

To deal with the iron deficiency, plants have developed two strategies, one based on the pre-reduction of iron previously to its transport (strategy I) and another based on its chelation (strategy II). The *Ferric Reductase Oxidase (FRO)* genes are key to the strategy I, because they encode a ferric chelate reductase enzyme which reduces Fe (III) to Fe (II). In *Medicago truncatula* six *FRO* genes were identified, however their organ-specific expression is unknown. In this work, we show that the *MtFRO1* and *MtFRO3* genes are expressed in root; the *MtFRO2* gene is expressed in leaf, flower and pod; the *MtFRO4* gene is expressed in leaf and root; the *MtFRO5* gene is expressed in root, stem and leaf and the *MtFRO6* gene is expressed in root, flower and pod. Additionally, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) are known to favor the availability of nutrients for the plant and its absorption. Our results show that the PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces the expression of *MtFRO* genes in different organs, having the greatest effect under iron deficiency conditions. We explain the phenomenon of *MtFRO* genes induction by Induced Systemic Tolerance (IST); which promotes abiotic stress resistance, triggered simultaneously with Induced Systemic Resistance (ISR) and Systemic Acquired Resistance (SAR) due to an induction of genes *MtDEF2.1* (related to ISR) and *MtPR1* (related to SAR) observed by *A. agilis* UMCV2 inoculation, having the greatest effect on iron deficiency.

**Keywords:** *Medicago truncatula*, *Arthrobacter agilis* UFM2, *MtFRO*, defense.

## 2. INTRODUCCIÓN

El Hierro (Fe) tiene una función central en reacciones bioquímicas esenciales: transporte de electrones durante la respiración y la fotosíntesis, cofactor para metaloproteínas que utilizan el oxígeno, el hidrógeno o el agua como sustratos (Karlin, 1993). El hierro participa en la biosíntesis de DNA (forma parte de la enzima ribonucleótido reductasa que cataliza la formación de deoxirribonucleótidos, utilizados para la síntesis de DNA) y en el metabolismo del nitrógeno (es un cofactor de enzimas de la vía reductiva asimilatoria, como nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamato sintasa) (Anshika y Connolly, 2013).

En las plantas, el hierro funciona en reacciones metabólicas vitales y su desequilibrio afecta el metabolismo celular (Vigani *et al.*, 2013). Este metal es esencial para la biosíntesis de la clorofila debido a que participa en la síntesis del ácido  $\delta$ -aminolevulinico, un primer componente de la vía de síntesis de porfirina que conduce a la síntesis de clorofila. El hierro también está involucrado en la formación de protoclorofilida, un precursor de la clorofila (Anshika y Connolly, 2013).

Por lo anterior el hierro es un nutriente esencial para todos los organismos, debido a su función fundamental en numerosos procesos celulares (Hell y Stephan, 2003). A pesar de que la abundancia del hierro es comúnmente alta en la geósfera, su escasa solubilidad en el suelo restringe su disponibilidad para las raíces de la planta (Mimmo *et al.*, 2014). Aproximadamente el 30% de los suelos del mundo son considerados limitados en hierro para el crecimiento de las plantas (Wu *et al.*, 2002).

La solubilidad del hierro disminuye en suelos con condiciones aerobias, especialmente en suelos alcalinos calcáreos (con elevadas cantidades de carbonato de calcio (Marschner, 1995). Teóricamente, la solubilidad del hierro disminuye 1000 veces por cada unidad de incremento del pH. En presencia del oxígeno, el hierro se precipita al formar complejos Fe(III)-oxihidróxido insolubles (Guerinot y Yi, 1994). Para enfrentar la baja disponibilidad de hierro, las plantas utilizan dos mecanismos orientados a movilizar dicho metal de la rizosfera y

transportarlo a través de la membrana plasmática de las células de la raíz. En la estrategia I, utilizada por todas las dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y depende de la acidificación de la rizosfera para aumentar la solubilidad del hierro a través de la liberación de protones mediante una enzima ATPasa (Curie *et al.*, 2003). Posteriormente, existe la secreción de compuestos fenólicos, carboxilatos y flavonoides a partir de la proteína “*Pleiotropic Drug Resistance 9*” (PDR9) que quelan Fe(III) (Ito y Gray, 2006). El Fe(III) libre o quelado es reducido a Fe (II) por acción de la enzima férrico quelato reductasa mediada por el gen “*Ferric Reductase Oxidase 2 (FRO2)*” (Robinson *et al.*, 1999). Finalmente, el hierro reducido es internalizado a las células de la raíz a través de la proteína “*Iron Regulated Transporter 1*” (IRT1) (Eide *et al.*, 1996) En la estrategia II, utilizada por las gramíneas, existe la liberación de fitosideróforos de la familia del ácido muginéico (MA por sus siglas en inglés) a través del transportador “*Transporter Of MA*” (TOM) para solubilizar Fe en la rizosfera (Nozoye *et al.*, 2011) y posteriormente, transportar el complejo Fe(III)-fitosideróforo a través de la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz vía la proteína transportadora “*Yellow Stripe*” 1 (YS1) (Curie y Briat, 2001).

Adicionales a las estrategias utilizadas por las plantas para la toma de hierro, existen microorganismos en el suelo con funciones en la mineralización y transformación de nutrientes dentro de la rizosfera. Entre estos microorganismos se encuentran las llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (por sus siglas en inglés) (Marschner *et al.*, 2011) que son capaces de modificar la disponibilidad de nutrientes a través de cambios en el ambiente: como la secreción de moléculas con capacidades quelantes y reductoras; estas capacidades permiten a las plantas la toma de nutrimentos, incluido el hierro (De Nobili *et al.*, 2001).

Además de modificar los nutrientes disponibles en el suelo, las PGPRs estimulan el crecimiento de las plantas mediante la síntesis de compuestos involucradas en el crecimiento como auxinas, citocininas e incluso ciclodipeptidos (Ortíz-Castro *et al.*, 2013) este tipo de promoción del crecimiento es nombrada promoción directa. La

promoción indirecta ocurre cuando las PGPRs eliminan o disminuyen el daño causado a las plantas por microorganismos deletéreos (Bashan, 1986).

En nuestro grupo de trabajo se ha observado el efecto de los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) producidos por la PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2, sobre las plantas *Medicago truncatula* y *Sorghum bicolor*. La presencia de los VOCs de *A. agilis* UMCV2, principalmente dimetilhexadecilamina (DMHDA) aumentó la longitud y biomasa de parte aérea y raíz, además del contenido de clorofila en *M. truncatula* (Orozco-Mosqueda, 2013) y en *S. bicolor* (Castulo *et al.*, 2015). Tanto los VOCs como la DMHDA producidos por *A. agilis* UMCV2, aumentaron la expresión de 5 genes *FRO* de *M. truncatula* en parte aérea y raíz (Montejano-Ramírez, 2014) y el gen *FRO* de parte aérea de *S. bicolor* (Castulo-Rubio, 2015), el efecto se incrementó en plantas crecidas en deficiencia de hierro. Por lo anterior se concluye que los VOCs de *A. agilis* UMCV2 participan regulan de manera positiva la respuesta a deficiencia de hierro. Recientemente en nuestro grupo de trabajo, se observó mediante Hibridación Fluorescente In situ (FISH, por sus siglas en inglés) que *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar a la planta *M. truncatula* en condiciones *in vitro* (Avilés-García *et al.*, 2016), sin embargo se desconoce el comportamiento de esta bacteria en condiciones de invernadero y si la presencia de ésta dentro de la planta tiene los mismos efectos de promoción de la expresión de los genes *MtFRO* que sus VOCs en condiciones artificiales *in vitro*. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluará el efecto de *A. agilis* UMCV2 como endófito de *M. truncatula* sobre la expresión de los genes *MtFRO*, además de la expresión órgano-específica de dichos genes, debido a que actualmente no se tiene un perfil de expresión de éstos y se desconoce el efecto de la bacteria sobre los genes *MtFRO* de cada órgano de la planta.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Características generales del hierro

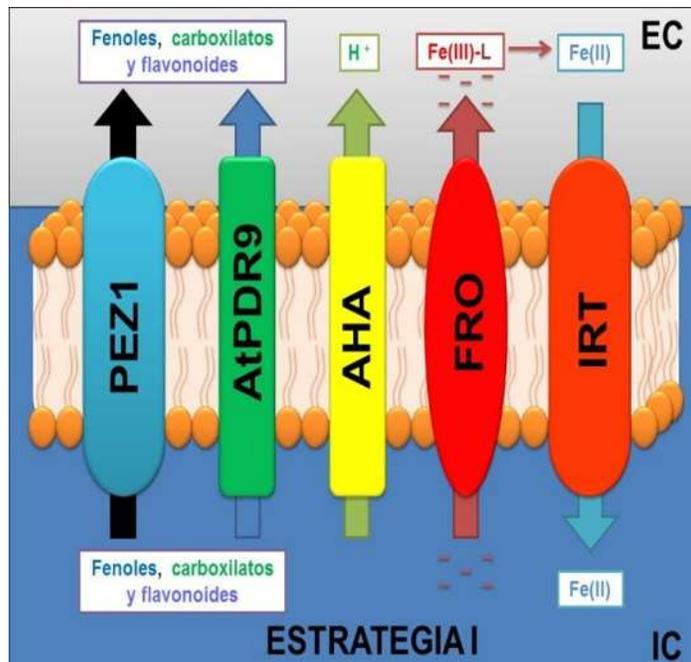
El hierro es un metal de transición con un número atómico de 26. Su símbolo es Fe (del latín *fĕrrum*) y tiene una masa atómica de 55.6 unidades de masa atómica unificada (u). Es un metal maleable, tenaz, de color gris plateado y presenta propiedades magnéticas (es ferromagnético a temperatura ambiente y presión atmosférica) (Garritz y Chamizo, 2001). El hierro se caracteriza por la relativa facilidad con la que puede cambiar su estado de oxidación (cambiar de Fe(III) a Fe(II)) y por su capacidad para formar complejos octaédricos con distintos ligandos, con una gran variación en el potencial redox de Fe(II)/Fe(III) dependiendo del ligando. Este metal es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después de silicio, oxígeno y aluminio, representa el 5.1% de su peso total, su contenido en suelo se estima en un 3,8% (Lindsay y Schawab, 1982). La mayoría del hierro se presenta en las estructuras cristalinas de numerosos minerales. Al igual que para el resto de nutrientes, el punto de partida del Fe en el suelo son los minerales primarios, que incluyen silicatos ferromagnéticos (olivino, augita, hornblenda y biotita); estos minerales constituyen la mayor fuente de hierro en las rocas ígneas. A partir de la meteorización (descomposición de minerales y rocas que ocurre sobre o cerca de la superficie terrestre cuando estos materiales entran en contacto con la atmósfera, hidrosfera y la biosfera) de los minerales primarios, se libera Fe soluble a la disolución, que podrá ser utilizado por los organismos, unirse a distintos ligandos orgánicos o bien ser transformado a minerales secundarios tales como sulfuros, carbonatos, minerales de arcilla, pero fundamentalmente óxidos e hidróxidos de distinta composición y grados de cristalización, que serán los que controlen principalmente la solubilidad de este elemento en el suelo (Murad y Fischer, 1988).

De los dos estados de oxidación en que se presenta el hierro en el suelo [férrico, Fe(III) y ferroso, Fe(II)], la planta toma preferentemente el Fe(II), para ello se ve obligada a reducir la forma predominante de hierro en los suelos aerobios (Fe(III)) (Bienfait, *et al.*, 1985). A pesar de su importancia, el hierro también puede ser tóxico

cuando se acumula a niveles altos, debido a que en su forma libre puede participar en la reacción de Fenton y generar radicales hidroxilo citotóxicos. Como resultado de ello, las vías de adquisición de hierro deben estar altamente reguladas, de modo que las plantas puedan adquirir cantidades suficientes de hierro para satisfacer las demandas de los diversos órganos, tipos de células y orgánulos evitando la sobrecarga de hierro. Es claro que la absorción, almacenamiento y la relocalización de hierro, son procesos cuidadosamente regulados (Anshika y Connolly, 2013).

### **3.2 Estrategia I para la absorción de hierro basada en la reducción**

En respuesta a la deficiencia de hierro, las plantas estrategia I (Fig. 1) llevan a cabo tres procesos para adquirir el hierro: Primero, la rizosfera es acidificada vía la extrusión de protones por una ATPasa localizada en la membrana plasmática (Santi y Schmidt, 2009). Dicha acción permite aumentar la solubilidad de los complejos de hierro férrico (Fe(III)). Los quelatos de hierro férrico (Fe(III)) posteriormente, son reducidos a hierro ferroso (Fe(II)) mediante la enzima FRO y subsecuentemente los iones de Fe<sup>2+</sup> son internalizados a las células de la raíz por el transportador de metales divalente "*Iron Regulated Transporter*" (IRT) (Eide *et al.*, 1996). El gen *IRT* es esencial, debido a que mutantes en *irt* presentan clorosis grave hasta que son suplementadas con grandes cantidades de hierro exógeno (Vert *et al.*, 2002). Las plantas también responden a la deficiencia de hierro a través de cambios morfológicos (raíz primaria más larga y mayor formación de raíces laterales) que resultan en aumentos en el área de superficie de la raíz para la reducción y absorción de hierro (Schmidt, 1999).



**Fig. 1. Estrategia I para la toma de hierro.** Las plantas dicotiledóneas absorben el hierro mediante una serie de procesos que involucran: la acidificación de la rizosfera (mediante ATPasas); la formación de quelatos (por la liberación de compuesto orgánicos a partir de PEZ1 y PDR9); la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  (por la enzima FRO) y la consecuente internalización de dicho metal (mediada por la proteína transportadora IRT). EC, representa el exterior celular; IC, indica el interior celular.

Por otra parte, existen elementos adicionales asociados al mecanismo basado en reducción, que incluyen la excreción de compuestos orgánicos a la rizosfera como carboxilatos, fenoles y flavonoides que forman complejos con el hierro, afectando su disponibilidad directa o indirectamente (Tomasi *et al.*, 2008). Se han propuesto a varios miembros de la familia de transportadores “*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*” (MATE) y “*ATP-Binding Cassette*” (ABC) en el tráfico de los compuestos orgánicos (Cesco *et al.*, 2010). “*Phenolics Efflux Zero*” (PEZ1), miembro de una subfamilia MATE, es inducido por la ausencia de hierro, se localiza en la membrana plasmática y está involucrado en el eflujo de los ácidos protocatéquico y cafeico (Ishimaru *et al.*, 2010). PEZ1 es requerido para la movilización de hierro en el estele de arroz y las plantas transgénicas con sobreexpresión de *PEZ1* crecen mejor en suelos con pH alto y una baja disponibilidad de hierro (Ishimaru *et al.*, 2011). La contraparte de PEZ1 no ha sido identificada en plantas no gramíneas (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013) Adicionalmente *AtPDR9*, miembro de la familia “*Pleiotropic Drug Resistance*” (PDR),

subfamilia de los transportadores ABCG37, se expresa predominante en la cubierta de las raíces laterales en la punta de la raíz en respuesta a deficiencia de hierro (Ito y Gray., 2006) y está involucrado en la secreción de compuestos fenólicos desde la raíz al medio en respuesta a deficiencia de hierro (Fourcroy *et al.*, 2014).

### 3.2.1 Regulación de la expresión génica en plantas estrategia I

Los genes *FRO* e *IRT* son regulados por el factor de transcripción “*Fer-Like Iron deficiency-induced Transcription factor*” (FIT) (Bauer *et al.*, 2007). FIT es un ortólogo funcional de FER, factor de transcripción tipo “*Basic Helix-Loop-Helix*” (bHLH) esencial para la respuesta a deficiencia de hierro en tomate (Ling *et al.*, 2002). FIT controla la maquinaria de absorción de hierro a múltiples niveles: *FRO* es regulado transcripcionalmente por FIT, mientras que *IRT* es regulado tanto transcripcional como postranscripcionalmente por FIT (Colangelo *et al.*, 2004). Se ha demostrado una regulación dual de FIT por deficiencia de hierro. A nivel transcripcional, *FIT* es inducido por deficiencia de hierro con la subsecuente acumulación de proteínas. La regulación postranscripcional de FIT, se demostró con el uso de inhibidores proteosomales (MG132) y traduccionales (cicloheximida). En condiciones de hierro limitado, la proteína FIT se sintetiza promueve la transcripción de los genes *IRT* y *FRO2* y rápidamente es ubiquitinizada lo que ocasiona su degradación proteosomal 26S. La síntesis y degradación de FIT permite ciclos transcripcionales subsecuentes y la amplificación de la transcripción de genes blancos de *FIT* (Sivitz, *et al.*, 2011). La sobreexpresión de *FIT* no afecta la expresión de *FRO* ni de *IRT* en la raíz, debido a que éste requiere de otros factores de transcripción bHLH adicionales (los bHLH 38/39/100/101) con los que forma forma heterodímeros para ser funcional (Yuan *et al.*, 2005; Giehl *et al.*, 2009).

Otros factores de transcripción que se han encontrado y se les ha involucrado en la homeostasis del hierro son: I) POPEYE (PYE), un factor tipo bHLH y II) BRUTUS (BTS), una ubiquitina ligasa E3 putativa que se inducen en deficiencia de hierro y presentan una expresión más alta en el periciclo de la raíz (Long *et al.*, 2010). PYE fue localizada en el núcleo de todas las células en raíces sometidas a deficiencia de hierro, sugiriendo que después de la inducción en el periciclo por

deficiencia de hierro, PYE podría moverse a través de la raíz. La mutante *pye-1* exhibe clorosis e inhibición del crecimiento radicular en condiciones de hierro deficiente, lo que sugiere que PYE es un regulador importante de la deficiencia de hierro. Análisis de inmunoprecipitación de cromatina acoplada a microarreglos de DNA (ChIP-chip) revelaron que PYE tiene como blanco genes clave implicados en la homeostasis de metales: la nicotianamina sintasa (*NAS4*), *FRO6* que codifica una férrico quelato reductasa y *ZIF1*, transportador localizado en la vacuola, importante para la tolerancia a Zn (Haydon *et al.*, 2007).

En las mutantes *pye-1*, la expresión de estos genes aumenta significativamente, lo cual sugiere que PYE actúa normalmente reprimiendo la actividad de dichos genes. Ensayos de doble híbrido en levadura sugieren que la proteína PYE interactúa con factores de transcripción tipo bHLH, incluyendo “*IAA-LEUCINE RESISTANT3*”(ILR3), involucrado en la homeostasis de hierro. Adicionalmente, ILR3 interactúa con una tercera proteína, BTS. Por lo anterior, se sugiere que la proteína PYE interactúa indirectamente con BTS. Adicionalmente, estudios en mutantes *bts-1* con pérdida parcial de función, exhiben un aumento en la longitud de raíces y acidificación de la rizosfera en condiciones de hierro limitado, lo que sugiere que BTS es un regulador negativo de la respuesta a deficiencia de hierro (Long *et al.*, 2010). La proteína codificada por BTS consiste de varios dominios conservados, incluyendo tres de hemeritina (HHE) de unión a cationes localizados cerca del N terminal; un dominio tipo dedo de zinc (CHY) y otro “*Really Interesting New Gene*” (RING) cercano a la región C terminal (Kobayashi *et al.*, 2013).

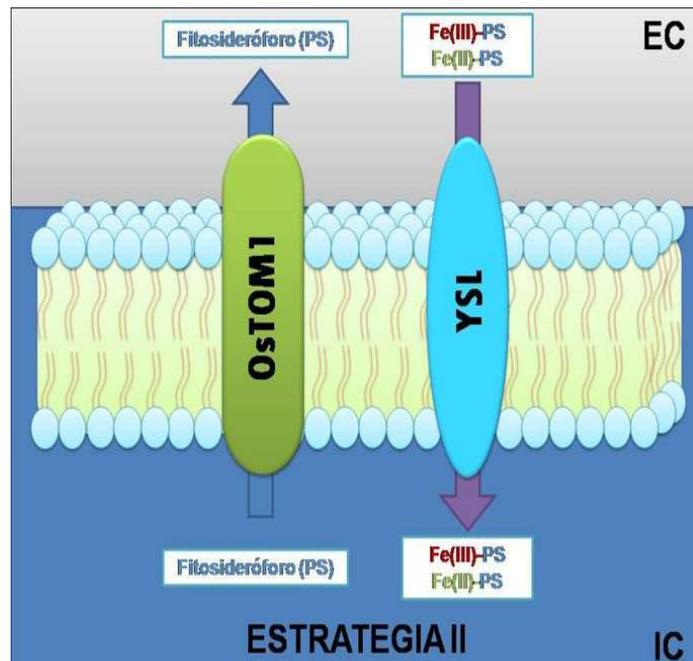
El hierro está típicamente coordinado dentro del dominio HHE vía las cadenas carboxiladas laterales de los aminoácidos Glu, y Asp y cinco residuos de histidina (Shu *et al.*, 2012). La presencia del dominio RING sugiere que éste podría tener capacidad de ligasa E3 (Kobayashi *et al.*, 2013). Estudios recientes realizados en *Arabidopsis thaliana* con la recombinante *ProBTS::β-GLUCORINADASA* sugieren que BTS se expresa en los embriones en desarrollo y otros tejidos reproductivos. Los resultados obtenidos en este estudio, también indican que la interacción entre BTS y factores de transcripción bHLH similares a PYE ocurre dentro de núcleo y

son dependientes de la presencia del dominio RING. Adicionalmente, se han presentado evidencias de que BTS facilita la degradación de proteína PYEL (PYE-like) en el proteosoma 26S en ausencia de hierro. Finalmente, se reveló que después de la unión de hierro al dominio HHE de BTS, esta última se desestabiliza, lo cual depende de residuos específicos dentro del dominio HHE. Este estudio proporcionó un mecanismo único e importante para la homeostasis de hierro en plantas donde una ubiquitina ligasa E3 controla postraduccionalmente componentes de la red transcripcional regulatoria involucrada en la respuesta a deficiencia de hierro (Selote *et al.*, 2015).

### **3.3 Mecanismo de las plantas estrategia II basado en quelación de hierro**

Las monocotiledóneas gramíneas, realizan la liberación de fitosideróforos (PS, por sus siglas en inglés), como el ácido mugineico (MA), que une el  $Fe^{3+}$  con gran afinidad, a fin de adquirir hierro desde la rizosfera en condiciones limitadas de este metal (Fig. 2) (Conte y Walker, 2011). Los fitosideróforos se sintetizan a partir de la nicotianamina (NA), un aminoácido formado por la condensación de tres moléculas de S-adenosil metionina. Aun cuando todas las plantas sintetizan NA, que funciona como un quelante de metales de transición, sólo las gramíneas pueden convertir la NA en PS. Una vez liberados a la rizosfera, los fitosideróforos forman complejos Fe(III)-PS que posteriormente son internalizados a la célula mediante el transportador “*Yellow Stripe 1*” (YS1), aislado por primera vez en maíz (Curie *et al.*, 2001). Análisis electrofisiológicos revelaron que YS1 funciona como un simportador protón-acoplado, para varios metales de unión a ácido mugineico (MA), incluyendo Fe (III), Zn(II), Cu(II) y Ni(II) (Schaaf *et al.*, 2004). Dos transportadores, “*Major Facilitator Family*” (MFS), “*Transporter Of MA*” (*OsTOM1* y *HvTOM1*) de arroz y cebada respectivamente, están involucrados en el eflujo de PS. Lo anterior debido a que oocitos de *Xenopus* que expresaban cualquiera de los dos transportadores pudieron liberar al ácido deoximugineico etiquetado con  $C^{14}$ , pero no a la NA marcada con  $C^{14}$ . Adicionalmente se caracterizaron dos miembros más de la familia MFS en arroz: ENA1 y ENA2, que fueron identificados como transportadores de NA por su capacidad para transportar NA etiquetada con  $C^{14}$ , pero no ácido

deoximugineico etiquetado de la misma forma (Nozoye *et al.*, 2011). ENA es similar a AtZIF1, que se localiza en la membrana vacuolar y está involucrado en la detoxificación de Zn. A pesar de que originalmente AtZIF1 se consideró como un transportador de Zn, una mutante *atzif1* funcionó de forma similar a ENA1, implicando a AtZIF1 como un transportador de NA (Haydon *et al.*, 2012). El arroz posee un transportador OsIRT1 que puede internalizar  $\text{Fe}^{2+}$ . Lo anterior fue demostrado usando una mutante de arroz en el gen “NICOTIANAMINE AMINOTRANSFERASA” (NAAT), incapaz de sintetizar PS, sin embargo, dicha mutante creció normalmente cuando era suplementada con  $\text{Fe}^{2+}$  (Cheng *et al.*, 2007). A pesar de estos antecedentes, se sabe que las plantas estrategia II no presentan actividad férrico quelato reductasa, que es clásica de la estrategia I. Esto se debe probablemente a una adaptación del arroz a los suelos anegados, que son suelos anaerobios con altos niveles de  $\text{Fe}^{2+}$  (Ishimaru *et al.*, 2006).



**Fig. 2. Estrategia II para la toma de hierro.** Las plantas monocotiledóneas sintetizan fitosideróforos, como el ácido mugineico, los cuales son secretados mediante la proteína TOM1 y forman quelatos con  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ . Los complejos  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -fitosideróforos, son internalizados a las células epidérmicas de la planta; disociándose y quedando el hierro disponible para la planta. EC, representa el exterior celular; IC, indica el interior celular.

### 3.3.1 Regulación química en las plantas estrategia II

En los perfiles de expresión de microarreglos en arroz, la proteína bHLH, OsIRO2 fue identificado como un factor de transcripción que es sobrerregulado en deficiencia de Fe (Ogo *et al.*, 2006). *IRO2* se expresa tanto en raíces y brotes en condiciones de hierro deficiente. Cuando *OsIRO2* se sobreexpresa, las plantas crecen mejor comparadas con las Wild Type (Wt) bajo condiciones de deficiencia de hierro; mientras que en plantas con iRNA, el crecimiento es menor que la Wt. Adicionalmente, las líneas de sobreexpresión presentan mayor expresión de los genes involucrados en la síntesis y transporte de PS, mientras las líneas iRNA presentan disminución en la expresión de los mismos genes (Ogo *et al.*, 2011). Iron “*Deficiency binding Factor*” 1 y 2 (OsIDEF1 y 2), miembros de las familias de factores de transcripción ABI3/VP1 y NAC, respectivamente, también han sido identificados como reguladores positivos de la respuesta a deficiencia de hierro debido a su habilidad para unirse a secuencias que confieren regulación al hierro en el promotor *IDS2* específico de la raíz de cebada. Estas secuencias son llamadas “*Iron Deficiency-Responsive Elements*” 1 y 2 (IDE1 e IDE2) (Kobayashi *et al.*, 2003). Interesantemente, secuencias homólogas a IDE1 también se encuentran en otros promotores inducibles por deficiencia de hierro, como OsNAS1, OsNAS2, OsIRT1, AtIRT1, AFRO2, OsIDEF1 y OsIDEF2. Los transcritos OsIDEF1 se expresan constitutivamente y los niveles no dependen del contenido de hierro (Kobayashi *et al.*, 2007). Plantas de arroz con iRNA en *OsIDEF1* son susceptibles a estadios tempranos en deficiencia de hierro, mientras que en plantas con sobreexpresión de *OsIDEF1* son más tolerantes a la deficiencia de dicho metal. Análisis de expresión diferencial, revelaron que, en condiciones de hierro limitante, *OsIDEF1*, regula positivamente la inducción de varios genes involucrados en la absorción de hierro en arroz: *OsIRO2*, *OsYSL15*, *OsYSL2*, *OsIRT1*, *OsNAS1*, *OsNAS2* y *OsNAS3* (Kobayashi *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que OsIDEF1 podría funcionar en la percepción del estado de deficiencia de hierro (Kobayashi *et al.*, 2012). A través de análisis de transcriptoma de arroz en condiciones de deficiencia de hierro, otro factor

de transcripción bHLH se ha identificado en la homeostasis de hierro. Este factor de transcripción, *OsIRO3* se induce altamente tanto en raíz como en parte aérea en condiciones de deficiencia de hierro. Plantas de arroz con sobreexpresión de *OsIRO3* fueron hipersensibles a deficiencia de hierro y lo acumularon menos hierro en la parte aérea que las Wt. Adicionalmente, genes que se expresan normalmente en deficiencia de hierro como *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsIRO2*, *OsIRT1*, *OsYSL15* y *OsNRAMP1* no se inducen en plantas que sobreexpresan *OsIRO3*. Análisis filogenéticos mostraron que *OsIRO3* es el más similar de tres ortólogos de arroz, a *POPEYE* de *A. thaliana*. Estos datos proponen a *OsIRO3* como un regulador negativo de la respuesta a deficiencia de hierro en arroz y que actúa río arriba de *OsIRO2* (Zheng *et al.*, 2011).

### 3.4 Homeostasis del hierro

El proceso de homeostasis de hierro involucra la internalización de este metal a las células epidérmicas de las raíces de las plantas por diferentes mecanismos (estrategia I y II) mediante los cuales, dicho metal es reducido o quelado. Posteriormente dentro de la célula, el hierro es movilizado a los distintos órganos de la planta a través del xilema o floema, formando complejos con citrato o nicotianamina (Abadía *et al.*, 2011). El hierro solubilizado Fe(II) entra en el espacio apoplástico donde constituye el 75% del Fe total de la raíz (Bienfait *et al.*, 1985). Después de entrar a las células epidérmicas de la raíz, el Fe se mueve simplásticamente vía plasmodesmata hacia la vasculatura y es llevado desde las células del parénquima del xilema a los vasos del xilema donde es quelado por citrato para formar un complejo tri-Fe(III) tri-citrato para realizar el transporte a larga distancia a la parte aérea (Larbi *et al.*, 2010). Los elementos clave en este proceso son los miembros de la familia “*Multidrug and Toxin Efflux*” (MATE), “*Ferric Reductase Defective 3*” (FRD3) y uno de los dos miembros de la familia “*Iron Regulated 1/Ferroportin 1*” (IREG1/FPN1) (Green y Rogers, 2004). El transportador FRD3 se localiza en el periciclo de la raíz (Rogers y Guerinot, 2002) y transporta citrato desde las células del parénquima del xilema a los vasos del xilema (Durrett

*et al.*, 2007) y actúa en conjunto con IREG1/FPN1, el cual modula el eflujo de Fe en los vasos del xilema. La carencia de transporte de hierro a larga distancia en los vasos del xilema resulta en la clorosis de parte aérea y afecta la señalización de Fe en la mutante *frd3*. La mutación en *ireg1/fpn1* no afecta la acumulación de hierro en la vasculatura de la raíz, sugiriendo la presencia de otro transportador de que funcione redundantemente (Morrissey *et al.*, 2009).

El siguiente paso en el transporte de Fe dentro de la planta incluye la reabsorción de Fe desde el apoplasto de los vasos del xilema en la parte aérea para su distribución en las células del parénquima de la hoja, carga de floema apoplástico para su distribución en tejidos demandantes y recirculación del floema en la raíz. Los transportadores involucrados en este proceso pertenecen a 2 clados distintos de la familia “*Oligopeptide Transporter*” (OPT), el transportador Yellow Stripe-like 1 (YSL1) y OPT, del cual se nombra la familia. El transportador YSL1 está involucrado en el transporte de metales a larga distancia (Fe, Cu y Zn) asociados a nicotianamina (DiDonato *et al.*, 2004). Por otro lado, OPT3 contribuye en la carga de hierro a la semilla y la pérdida de función en la mutante *opt3-1* causa letalidad en el embrión (Stacey *et al.*, 2002). OPT3 se expresa en el floema donde se localiza con células acompañantes y funciona en la distribución de Fe(II) desde órganos fuente (hojas maduras) a órganos demandantes (hojas jóvenes y semillas) (Mustroph *et al.*, 2009). Adicionalmente OPT3 funciona en el reciclado de Fe desde el xilema y actúa como liga funcional entre xilema y floema (Zhai *et al.*, 2014).

Se cree que los organelos como la mitocondria y cloroplastos presentan una función central en la economía del hierro celular, debido a que este metal funciona como cofactor esencial para muchas enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones en mitocondria y en los complejos fotosintéticos en el cloroplasto. Se ha demostrado que la deficiencia de hierro cambia la estructura y función de la mitocondria (Vigani y Zocchi, 2009). Los supercomplejos “*Photosystem I Light-Harvesting Complex I'*” (PSI-LHCI) también exhiben alteraciones estructurales y funcionales bajo condiciones de deficiencia de hierro (Yadavalli *et*

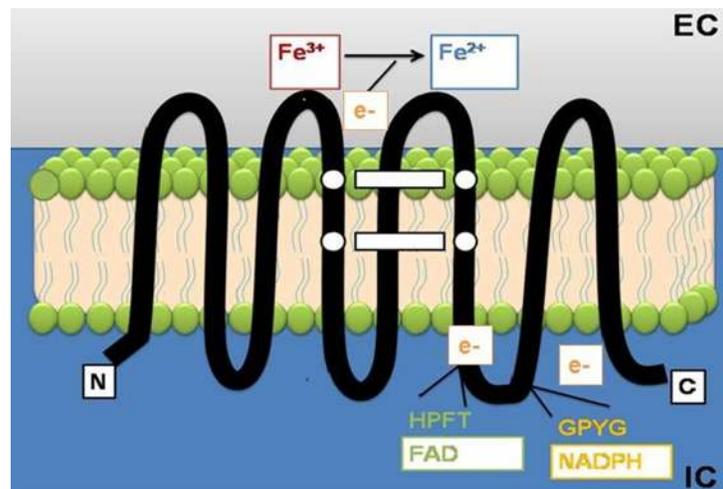
*al.*, 2012). Por tanto, la deficiencia de hierro afecta los procesos respiratorios y fotosintéticos. Sin embargo, el hierro excesivo exagera la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en estos centros redox, lo que ocasiona efectos deletéreos en la célula. Por lo tanto, el metabolismo del hierro en mitocondria y cloroplasto son de particular importancia para la homeostasis celular del hierro (Nouet *et al.*, 2011).

Una variedad de proteínas está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del hierro mitocondrial. El descubrimiento y la caracterización del transportador “*Mitochondrial Iron Transporter*” (MIT) en el arroz, el cual está involucrado en la absorción de hierro por la mitocondria, y la chaperona de hierro mitocondrial, frataxina (FH) han demostrado la importancia de la absorción mitocondrial de hierro y el tráfico/distribución para el crecimiento y desarrollo de la planta (Busi *et al.*, 2006). Se cree que la mitocondria también contiene la proteína de almacenamiento, ferritina que sirve para almacenar hierro y protegerla contra la producción de ROS catalizada por hierro (Briat *et al.*, 2010). El descubrimiento de un exportador de hierro mitocondrial (MIE) en ratón provee nuevas evidencias para el entendimiento de la homeostasis intracelular de hierro (Ichikawa *et al.*, 2012). El descubrimiento de los transportadores Yellow Stripe-Like (YSL4 y YSL5) de *Arabidopsis*, que están involucrados en la liberación de hierro de los cloroplastos, sugiere posibles funciones para otros miembros de la familia YSL en el eflujo de hierro mitocondrial (Divol *et al.*, 2013). Recientemente se identificó la mutante “*yellow and sensitive to iron-deficiency 1*” (*yid1*) hiper sensible a deficiencia de hierro. El gen *YID1* codifica para la subunidad MED16 del complejo mediador en *Arabidopsis*. Se demostró que *YID1/MED16* interactúan con la subunidad *MED25*, la cual tiene una función importante en la regulación de la homeostasis del hierro por interacción con “*ethylene-insensitive 3*” (*EIN3*) y “*ethylene insensitive 3-like 1*” (*EIL1*), dos factores de transcripción de la señalización del etileno asociados a la regulación de la homeostasis de hierro. Las mutantes *yid1* y *med25* fueron afectadas por la deficiencia de hierro y presentaron niveles de transcripción reducidos para “*Fer-Like Iron deficiency-induced Transcription factor*” (*FIT*), “*Iron*

*Regulated Transporter* (IRT1) y *Ferric Reductase Oxidase 2* (FRO2) bajo condiciones de deficiencia de hierro. Los resultados indican que YID1/MED16 y MED25 regulan positivamente la homeostasis de hierro en *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 2014).

### 3.5 Estructura de la enzima FRO

La enzima férrico quelato reductasa es requerida por las plantas para adquirir hierro soluble (Fig.3). Los genes *FRO*, que se expresan en plantas en deficiencia de Fe, codifican dicha enzima. Estos genes pertenecen a la superfamilia de los flavocitocromos que transportan electrones a través de la membrana. Estudios de la topología de la proteína AtFRO2 revelaron que contiene ocho hélices transmembranales, cuatro de las cuales comprenden el núcleo altamente conservado de la proteína. Este núcleo se conserva a través de la familia de flavocitocromos. El dominio soluble en agua de AtFRO2, contiene NADPH, FAD y la secuencia motivo óxidorreductasa que se localiza en el citosol. AtFRO2 también contiene cuatro residuos altamente conservados de histidina que coordinan dos grupos hemo intramembranosos que intervienen en el proceso de transferencia de electrones (Robinson *et al.*, 1999).



**Fig. 3. Estructura de la enzima FRO.** La enzima FRO contiene ocho hélices transmembranales, cuatro de los cuales conforman un dominio hidrofílico, en el cual se localizan los motivos característicos de la enzima: NADPH, FAD y férrico reducción. En la enzima FRO, se encuentran dos grupos hemo, coordinados por cuatro histidina; dichos grupos modulan la etapa final de la transferencia de electrones.

### 3.5.1 Los genes *FRO* en plantas estrategia I

Aunque en algas no se reporta la presencia de genes *FRO*, *Chlamydomonas reinhardtii*, presentó un aumento de 15 veces en la actividad férrico quelato reductasa en deficiencia de hierro. Estos resultados indican que la asimilación de hierro por *C. reinhardtii* involucra un paso de reducción, semejante al mecanismo de absorción de hierro en plantas superiores estrategia I (Eckhardt y Buckhout, 1998). Adicionalmente, el alga verde *Chlorella kesslerii* presentó un mecanismo reductivo para adquirir Fe(III) desde el ambiente extracelular, en el cual una férrico reductasa, reduce quelatos de Fe(III) a Fe(II) (Sonier y Weger, 2010). Recientemente, se estudiaron los mecanismos de absorción de hierro en la microalga *Dinobryon*, debido a que ésta crece en ambientes de hierro limitante. Se demostró que *Dinobryon* presenta actividad férrico reductasa estimulada por la luz, sin embargo, la privación de hierro no aumentó esta actividad pero si inhibió la absorción de hierro contrario a lo observado en otras algas (Carmel *et al.*, 2014).

En plantas estrategia I, existen varios reportes de genes *FRO*. El primer gen *FRO* aislado fue *FRO2* en *A. thaliana*, el cual se expresó en raíces en deficiencia de hierro. La férrico quelato reductasa de las raíces de la planta tiene similitud funcional y estructural con la enzima humana NADPH-oxidasa fagocítica gp91phox y con las férrico quelato reductasas de levadura FRE1 y FRP1. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligos degenerados diseñados para alinear con la secuencia que codifica el único motivo tetrapéptido (sitio de unión a FAD) común a gp91phox y FRE, además del motivo conservado asociado con los sitios de unión a NADPH; se amplificaron varios productos a partir del DNA genómico de *A. thaliana*. Siete productos fueron clonados y secuenciados, de los cuales uno codificó para un polipéptido rico en serina. La secuencia de este producto de PCR fue usado para búsqueda genómica en librerías de DNA complementario, obteniéndose así, la secuenciación de un fragmento genómico que contenía los genes *FRO1* y *FRO2*. Se demostró mediante RT-PCR que la transcripción de *FRO2* en las raíces, fue más abundantes que *FRO1* y que estos últimos se acumularon en respuesta a la deficiencia de hierro. Los resultados

sugirieron que el aumento en la actividad férrico quelato reductasa bajo estas condiciones involucra la síntesis de la enzima, y no solamente la activación de la reductasa preexistente (Robinson *et al.*, 1999).

Posteriormente se identificaron ocho genes *FRO* en el genoma de *A. thaliana*, empleando como sonda la secuencia homóloga a *AtFRO2*. Se identificaron tres genes localizados en el cromosoma 1 de *Arabidopsis* y cinco más en el cromosoma 5. Las proteínas mostraron un alto nivel de similitud de secuencia de aminoácidos entre sí. Mediante un ensayo de actividad de la férrico quelato reductasa, descubrieron que *AtFRO2*, *AtFRO3*, *AtFRO4*, *AtFRO5*, *AtFRO7* y *AtFRO8* confieren un aumento significativo en la reducción de hierro respecto al control. Para analizar la actividad antes mencionada, los genes fueron clonados y expresados en células de levadura. Concluyeron que los seis genes *AtFRO* codifican una férrico quelato reductasa y funcionan en la homeostasis del hierro en *Arabidopsis*. Adicionalmente estudios de RT-PCR, mostraron que los genes *FRO* tienen una expresión tejido-específica: *AtFRO2* y *AtFRO3* se expresaron principalmente en raíces de *Arabidopsis*, *AtFRO5* y *AtFRO6* en los brotes y las flores, *AtFRO7* en los cotiledones y tricomas y *AtFRO8* en las venas de las hojas (Wu *et al.*, 2005). Mukherjee *et al.*, (2006) a través de un análisis de PCR acoplado a retrotranscripción (RT-PCR) examinaron la expresión de cada gen *FRO* en diferentes tejidos de *Arabidopsis* y a diferencia de Wu *et al.*, (2005), encontraron que *AtFRO2* y *AtFRO5* se expresan principalmente en las raíces, *AtFRO3* se expresa en raíces y brotes, *AtFRO6* y *AtFRO7* muestran alta expresión en todas las partes verdes de la planta y *AtFRO8* se expresa en los brotes. Los genes *FRO* también se han identificado en otras plantas.

En el chícharo (*Pisum sativum*) se describió que el gen *FRO1*, codifica una férrico quelato reductasa de 712 aminoácidos con dominios FAD, NADH y de oxidorreducción. Posteriormente, se analizó la capacidad de *FRO1* para conferir actividad férrico quelato reductasa cuando se expresa en levadura. Las células de levadura, fueron cultivadas en un medio deficiente de hierro para reprimir la

expresión de las férrico reductasas endógenas de la levadura. Las células deficientes de hierro que expresaban *FRO1* tenían una alta actividad reductasa en comparación con el control, mostrando que *FRO1* codifica una férrico quelato reductasa funcional. Se determinaron también los sitios de expresión de *FRO1* en raíces, hojas, y nódulos. De igual manera, se identificaron niveles de mRNA de *FRO1* en células epiteliales de la raíz, en células epidérmicas externas y en células del mesófilo de las hojas de plantas crecidas en deficiencia de fierro. De acuerdo con los autores, estos resultados indican que *FRO1* participa en la toma de hierro por parte de la raíz, además de intervenir en la distribución de este metal a través de toda la plantan y en la fijación de nitrógeno (Waters *et al.*, 2002) contrastando con los hallazgos de Wu *et al.*, (2005) y de Mukherjee *et al.*, (2006).

En este mismo sentido, Holden *et al.*, (1991), identificaron la actividad férrico quelato reductasa en la membrana plasmática de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Posteriormente se aisló y caracterizó el gen *LeFRO1* de dicha planta, el cual codifica para una férrico quelato reductasa. Se mostró que cuando este gen se expresa en levadura, incrementa la actividad de la proteína mencionada. Además, por medio de análisis de RT-PCR, se detectó que *LeFRO1* tiene distintos sitios de expresión: en raíces, hojas, cotiledones, flores y frutos jóvenes. Los niveles de abundancia de mRNA de *LeFRO1* fueron menores en los frutos jóvenes en comparación con otros tejidos. Se observó también, que la transcripción del gen *LeFRO1* en las raíces, depende del contenido de hierro, mientras que en las hojas se expresa constitutivamente. Con base en estos resultados, los autores concluyen que se requiere *LeFRO1* en raíces y brotes, así como en los órganos reproductivos, para la homeostasis de hierro (Li *et al.*, 2004).

Li *et al.*, (2002), compararon la expresión del gen *CjFRO2* en *Citrus junus* (tolerante a la deficiencia de hierro) y el gen *PtFRO2* de *Poncirus trifoliata* (susceptible a la deficiencia de hierro) para observar las diferencias fisiológicas causadas en plantas con varios modelos de tolerancias al estrés por hierro. La actividad de la férrico quelato reductasa fue detectada en las raíces, y se estimuló

aproximadamente 20 veces en *Citrus junos* y sólo alrededor de 3 veces en *Poncirus trifoliata*. Además, se determinó la expresión del gen en tejidos de *Citrus junos* y *Poncirus trifoliata* bajo estrés de hierro. Se observaron altos niveles de transcrito en la parte de absorción de la raíz, tallo verde y hojas nuevas de *Citrus junos* bajo estrés de hierro durante dos semanas. En *Poncirus trifoliata* los transcritos se acumularon sólo ligeramente. Los resultados mostraron que el aumento evidente de la actividad de la férrico quelato reductasa fue una razón importante para la tolerancia de *Citrus junos* a la deficiencia de hierro, pero ante la deficiencia de hierro no todas las plantas son inducidas con la misma intensidad.

El pepino (*Cucumis sativus* L. cv Ashley), es otra de las plantas en las cuales se han estudiado los genes *FRO*. Waters *et al.*, (2007), clonaron y caracterizaron los genes *CsFRO1* y *CsIRT1* del pepino, que codifican una férrico quelato reductasa y un transportador de membrana para la internalización de hierro. También aislaron dos genes H(+)-ATPasa en las raíces: *CsHA1* y *CsHA2*. Observaron que la expresión del primer gen está regulada por la deficiencia de hierro, mientras que el gen *CsHA2* se expresa de forma constitutiva. Los autores utilizaron tratamientos con inhibidores y precursores de etileno, teniendo como antecedentes que éste participa en la regulación de la actividad de la férrico quelato reductasa, la acidificación de la rizósfera y el desarrollo de los pelos radiculares subapicales. Obtuvieron que, la expresión de *CsHA1*, *CsFRO1* y *CsIRT1* se disminuyó en las raíces deficientes de hierro por el tratamiento con los inhibidores de etileno, como Co (cobalto) o AOA (ácido aminooxiacético). El tratamiento con precursores de etileno, como ACC (ácido 1 -aminociclopropano-1 - carboxílico) o Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), resultó en un incremento de la expresión de *CsHA1*, *CsFRO1* y los niveles de transcripción *CsIRT1*. Con estos resultados, los autores concluyen que el etileno está implicado en la regulación de la expresión de los genes *CsHA1*, *CsFRO1* y *CsIRT1*.

Por su parte Ding *et al.*, (2009) generaron policultivos de plantas de cacahuate con plantas de maíz y observaron que las raíces del maíz en policultivos,

secretaban mayores cantidades de fitosideróforos (durante la floración del cacahuate) en comparación con las raíces del maíz en monocultivo. Del cacahuate (*Arachis hypogaea*), aislaron el gen *AhFRO1*, el cual codifica una férrico quelato reductasa. Para confirmar la función del gen *AhFRO1*, éste se clonó y expresó en levadura, confiriendo actividad férrico quelato reductasa a las células. Los mRNA de *AhFRO1* se acumularon en condiciones de deficiencia de hierro. Ding *et al* (2009) también identificaron que durante la pre-antesis, la actividad de la férrico quelato reductasa y los niveles de transcripción de *AhFRO1* fueron similares en monocultivo y policultivo de cacahuate con maíz. Interessantemente Observaron también que cuando las plantas de cacahuate desarrollaron clorosis inducida por deficiencia de hierro tanto la actividad de la férrico quelato reductasa como los niveles de transcrito de *AhFRO1* fueron mayores en policultivo que en cacahuates en monocultivo. Los investigadores llegaron a la conclusión de que el gen *AhFRO1* del cacahuate y los fitosideróforos del maíz cooperan para mejorar la absorción de hierro, pero el mecanismo por el cual esto sucede no se determinó.

El primer gen *FRO* de *Medicago truncatula* (*MtFRO1*), fue identificado por Andaluz *et al.*, (2009). Los autores analizaron la expresión de los genes que codifican para Fe reductasa en la raíz de *M. truncatula*, mediante RT-PCR semicuantitativo. Posteriormente, utilizaron secuencias conocidas de cDNA de *M. truncatula* como molde para diseñar oligonucleótidos específicos de genes. Las plantas fueron sometidas a deficiencia de hierro, y se observó una mayor expresión del gen *MtFRO1* en comparación con las plantas control, por lo cual, los autores concluyeron que dicho gen, participa en la homeostasis de este metal.

En un estudio realizado por Orozco-Mosqueda *et al.*, (2012), mediante una búsqueda *in silico*, identificaron otros cinco genes *FRO* en *M. truncatula*: *MtFRO2*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, *MtFRO5* y *MtFRO6*. Todos los genes *MtFRO* mostraron alta identidad con los genes *FRO* homólogos de *Lycopersicon esculentum*, *Citrus junos* y *Arabidopsis thaliana*. Las copias de genes también presentaron motivos FAD y NADPH, regiones transmembranales y motivos oxidoreductasa altamente

conservados. La expresión tejido-específica de los genes *MtFRO* fue detectada mediante análisis de RT-PCR. Se observó un patrón de expresión diferencial para cada gen *MtFRO* respecto al estatus nutricional por hierro. En condiciones de suficiencia hierro, *MtFRO1*, *MtFRO4* y *MtFRO5* presentaron una expresión considerado basal, mientras que *MtFRO3* y *MtFRO6* mostraron un nivel de expresión fuerte en los brotes. En condiciones deficientes de hierro, todos los genes *MtFRO* incrementaron su expresión en las raíces y los brotes. Los autores sugieren que el genoma de *M. truncatula* contiene múltiples copias de genes *FRO* funcionales, y que su patrón de expresión, probablemente depende de la concentración de hierro en el medio.

### 3.5.2 Genes *FRO* en plantas estrategia II

En plantas estrategia II, también se han reportado genes *FRO*. Con la finalidad de construir una visión general sobre la homeóstasis de hierro en el arroz (*Oryza sativa*), se analizaron un total de cuarenta y tres genes pertenecientes a cinco familias de proteínas conocidas: dieciocho “*Yellow Stripe*” (YS), dos *FRO*, trece “*Zinc regulated transporter/Iron regulated transporter Protein*” (ZIP), ocho “*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*” (NRAMP), y dos proteínas de ferritina. Para identificar los genes *FRO* se buscaron genes homólogos a *PsfRO1* y *AtFRO2* en las secuencias genómicas del arroz. Los dos genes *FRO* encontrados, fueron llamados *OsFRO1* y *OsFRO2*. Para examinar con más atención las similitudes de las proteínas de la familia *FRO*, se realizó un alineamiento múltiple de los polipéptidos *OsFRO* con los miembros *FRO* descritos anteriormente en *Arabidopsis* y el chícharo. Las proteínas *OsFRO* tienen todos los sitios previstos para los cofactores de unión hemo y dinucleótido, lo que sugiere una actividad funcional similar para estas nuevas enzimas. *OsFRO1* mostró más de 39 % de identidad con las proteínas de referencia. *OsFRO2* mostró identidad de sólo el 26 % con *AtFRO2* y *PsfRO1*. Sin embargo, considerando los aminoácidos altamente conservados en torno a los sitios catalíticos (cuatro histidinas que coordinan el grupo hemo, HPFT que corresponde al motivo de unión a FAD y GPYG al motivo de unión a NADPH)

es razonable considerar a OsFRO2 funcionalmente relacionado con otras proteínas FRO (Chandel *et al.*, 2010).

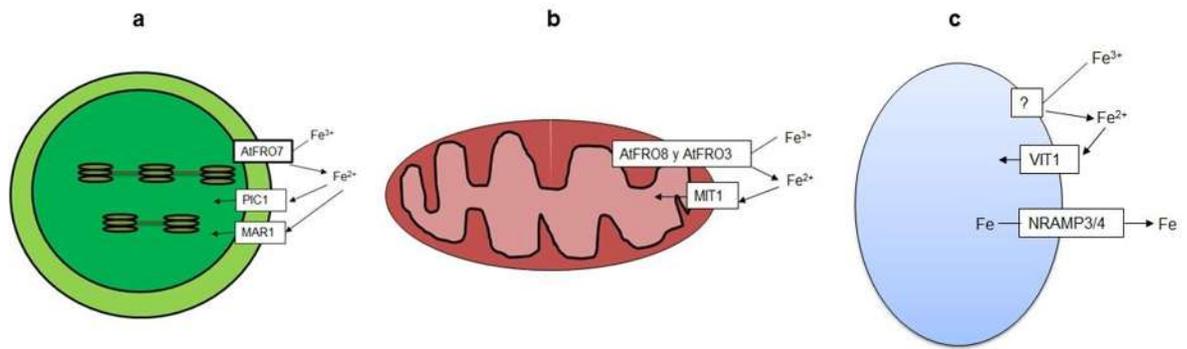
En la cebada (*Hordeum vulgare*), otra planta estrategia II, también se llevó a cabo la búsqueda de genes *FRO*. Mikami *et al.*, (2011) obtuvieron secuencias parciales de cDNA de *HvFRO1* y *HvFRO2*, sus clones genómicos por PCR invertido y secuencias del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) del cDNA de cebada. Posteriormente, las secuencias de las proteínas de *HvFRO1* y *HvFRO2* se compararon con las proteínas FRO del arroz y de *A. thaliana*: *HvFRO1* fue similar a *OsFRO1*, *AtFRO6*, y *AtFRO7*; *HvFRO2* fue similar a *OsFRO2*. Los autores confirmaron también por medio de RT-PCR, la expresión de *HvFRO1* y *HvFRO2* en hojas de cebada y observaron que la expresión *HvFRO1*, aumenta en deficiencia de hierro. Interesantemente, los autores señalan que estos genes no se expresaron en las raíces. En *Sorghum bicolor* (estrategia II), existe el reporte de un análisis semicuantitativo de la expresión de un gen *FRO*, sin embargo, los autores no reportan la secuencia de dicho gen, ni dan más información acerca de éste. Alejandre-Ramírez, (2012) realizó un análisis *in silico* para identificar las posibles secuencias de genes *FRO* en el genoma de *S. bicolor*: identificaron una secuencia que se agrupó con la del gen *OsFRO1* y mostró homología con otras secuencias de genes *FRO*, por lo tanto, se identificó como *SbFRO1*.

### **3.5.3 Localización intracelular de los genes *FRO***

Aunque el mecanismo involucrado en la adquisición de Fe en cloroplastos, no es claro, es probable que los cloroplastos adquieran tanto Fe(II) como Fe(III) vía múltiples rutas observado en cianobacterias modernas. Se ha demostrado que las cianobacterias de vida libre adquieren Fe a través de transportadores  $Fe^{2+}$  desde una poza de complejos Fe(III)-dicitrato (Kato *et al.*, 2001) lo que indica que algunas especies de cianobacterias son capaces de utilizar mecanismos basados en reducción para la absorción de hierro (Kranzler *et al.*, 2014). Los cloroplastos que se originaron de cianobacterias ancestrales, parecen utilizar una estrategia similar para la absorción de Fe. Estudios de *AtFRO7* demostraron que los cloroplastos

utilizan una estrategia basada en la reducción para la adquisición de hierro (Fig. 4a). *AtFRO7* se localiza en cloroplastos y una pérdida de función en dicho gen resulta en una reducción significativa en la actividad férrico reductasa en la superficie del cloroplasto. Adicionalmente, mutantes *Atfro7*, mostraron una reducción del 30% en el contenido de hierro en cloroplastos. Las mutantes *Atfro7* crecen pobremente en medio carente de sacarosa y muestran eficiencia fotosintética reducida, consistente con la idea de que *AtFRO7* es crucial para la entrega de Fe y la función adecuada de los complejos fotosintéticos (Jeong *et al.*, 2008). Trabajos en remolacha azucarera, también apoyan la existencia de un mecanismo basado en reducción para la toma de hierro por los cloroplastos (Solti *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha identificado un posible transportador de Fe en cloroplastos, PIC1 (Permease in chloroplast) (Duy *et al.*, 2007). Sin embargo, aún no está claro si *AtFRO7* y “Permease in Chloroplast 1” (PIC1) funcionan en conjunto para la toma de hierro en cloroplastos ni si PIC1 transporta Fe(II) o Fe(III). Estudios en *A. thaliana*, han identificad una chaperona de hierro (Vazzola *et al.*, 2007) y proteína de eflujo putativas involucradas en el metabolismo de hierro en mitocondria (Chen *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se describió un transportador de hierro mitocondrial en arroz (Fig. 4b), MIT1 que es esencial para el crecimiento de las plantas (Bashir *et al.*, 2011). A pesar de que se ha predicho que *AtFRO3* y *AtFRO8* se localizan en la membrana mitocondrial, su función no ha sido totalmente caracterizada (Heazlewood *et al.*, 2004). Las funciones de las *AtFRO3* y *AtFRO8* permanecen inciertas y no hay estudios que demuestren la participación de una metalorreductasa en la mitocondria de un organismo. Finalmente, se han reportado transportadores de Fe vacuolares en plantas. “Vacuolar iron transporter 1” (VIT1) de *Arabidopsis*, transportan hierro en el organelo (Fig. 4c), mientras que NRAMP3 y NRAMP4 modulan el exporte de Fe. Sin embargo, no se han reportado metalorreductasas vacuolares en plantas, hasta la fecha (Kim *et al.*, 2006).



**Fig. 4. Localización subcelular de las enzimas FRO en *A. thaliana*.** a) En el cloroplasto de *A. thaliana* se ha identificado la presencia de la enzima AtFRO7, la cual reduce Fe<sup>3+</sup> y éste es posteriormente internalizado al organelo a través de las proteínas PIC1 y MAR1. b) La mitocondria contiene dos enzimas FRO: AtFRO3 y AtFRO4, sin embargo, se desconoce si son funcionales. c) En la vacuola, no se han identificado metalorreductasas, pero se sabe que presenta importadores y exportadores de Fe.

### 3.6 Vía de señalización en respuesta a la deficiencia del hierro

Experimentos de injerto y división de raíz sugieren que existen dos señales sistémicas involucradas en la respuesta a deficiencia de hierro (Schikora y Schmidt, 2001). Las señales deben ser transmitidas por una cascada de traducción de señales que regula de la transcripción de genes efectores localizados río arriba del sistema de absorción de hierro. Aunque existen varios candidatos para la señalización de hierro a larga distancia en plantas, incluyendo el quelante de metales NA (Curie *et al.*, 2003), aún no se ha identificado un receptor local de Fe. Recientemente, se propuso que un receptor de Fe celular debe cumplir los siguientes criterios: (1) unirse a hierro o a moléculas íntimamente relacionadas, (2) cambiar su función en respuesta a la unión y (3) regular la homeostasis de hierro (Kobayashi y Nishizawa, 2014). Tanto IDEF1 y Zinc-Finger Protein / BRUTUS (HRZ/BTS) unen Fe y Zn y regulan respuestas a deficiencia de hierro, satisfaciendo los criterios 1 y 2. Selote *et al.*, (2015), reportaron que la estabilidad de BTS es dependiente del hierro, lo que resulta en el criterio 3. Adicionalmente se demostró que BTS producido por síntesis *in vitro* a partir del transcrito de BTS con un lisado de germen de trigo, fue menos abundante que cuando el hierro fue incluido en la reacción de traducción. Este efecto fue eliminado por una mutación en un residuo

putativo de unión a hierro en el dominio de hemeritrina, sugiriendo que el hierro unido al dominio de hemeritrina desestabiliza e inhibe la función de BTS.

Cuando hay una delección en el dominio de hemeritrina de BTS, se incrementa la estabilidad de la proteína. Sin embargo, ensayos de complementación usando mutantes knockdown *bts* de *Arabidopsis* revelaron que una versión trunca de BTS sin el dominio de hemeritrina funciona más o menos similar a BTS de longitud completa respecto con la respuesta fisiológica al hierro, sugiriendo la importancia limitada de la degradación de BTS vía el dominio de hemeritrina. La caracterización posterior de los mecanismos que involucran la degradación y función de HRZ/BTS en relación a la unión del hierro, Zn, oxígeno o clusters Fe-S es esencial para identificar si estos reguladores son los sensores centrales de hierro que determinan la respuesta río abajo a la deficiencia del hierro. De igual forma, es necesaria la identificación de mecanismos moleculares por los cuales IDEF1 altera su función debido a la unión de Fe o Zn. Es posible que la detección primaria de hierro en las células de la planta sea establecida por factores desconocidos, mientras que IDEF1 y HRZ/BTS modulan estos eventos, así como la respuesta apropiada a la deficiencia de hierro. En este escenario, la identificación de un regulador central que cambie su función en respuesta a la unión del hierro o moléculas íntimamente relacionadas, podría ser clave para como un receptor central de hierro (Kobayashi y Nishizawa, 2015).

### **3.6.1 Fitohormonas involucradas en la señalización de hierro.**

Se han propuesto fitohormonas involucradas en la respuesta a hierro, como las auxinas. Se ha sugerido la comunicación cruzada entre auxinas y la homeostasis de hierro son evidencias claras de que las auxinas intervienen en la respuesta morfológica de la raíz a deficiencia de hierro (Schmidit *et al.*, 2000). La deficiencia de hierro conduce a un aumento en la síntesis de auxinas en *Arabidopsis* lo que resulta en un incremento en la expresión de *FIT* y *FRO2*. La aplicación exógena de auxinas estimula la transcripción de estos genes. En mutantes con una sobreproducción de auxina, la expresión de *yucca*, *FIT* y *FRO2* incrementó en

deficiencia de hierro en comparación con plantas Wt (Chen *et al.*, 2010). Lo anterior para plantas estrategia 1.

En plantas estrategia II, como el arroz, se ha demostrado que las auxinas modulan el proceso de desarrollo de la arquitectura de la raíz (Romera *et al.*, 2011). Plantas de arroz con una mutación en el factor de transcripción de genes de respuesta a auxinas, *OsARF12*, alteró la arquitectura de la raíz y el contenido de micronutrientes esenciales fue menor que en plantas Wt. Estos resultados indican que *OsARF12* funciona en la comunicación cruzada entre la respuesta a auxinas y la señalización del hierro (Qi *et al.*, 2011). El etileno es otra de las fitohormonas involucradas en la señalización de deficiencia de Fe. En plantas estrategia I, crecidas en deficiencia de Fe, se produce etileno (Romera *et al.*, 2004) y afectan la expresión de *FIT* o *FER*, el etileno puede regular la respuesta a deficiencia de Fe en *Arabidopsis* y tomate (Waters *et al.*, 2007). El tratamiento con ACC (un precursor de etileno) de *Arabidopsis* y tomate en deficiencia de hierro, aumenta la expresión de *FIT* o *FER* y por tanto, también se aumenta la expresión de *FRO* e *IRT*. El tratamiento con inhibidores de etileno en plantas crecidas en hierro limitante, reprime la expresión de estos genes (Lucena *et al.*, 2006).

La idea de que el etileno está involucrado en la homeostasis de hierro en plantas estrategia II, proviene de un estudio en arroz. La producción de etileno por raíces de arroz crecidas en deficiencia de hierro, aumentó y el tratamiento con ACC confirió tolerancia de deficiencia de hierro. Adicionalmente, se demostró que la abundancia de transcrito de *OsIRO2*, *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsYSL15* y *OsIRT1* aumentó, demostrando que el etileno está involucrado en la regulación positiva de sistemas de absorción de hierro Fe(II) y Fe (III) (Wu *et al.*, 2011).

El Óxido Nítrico (NO), al igual que el etileno y las auxinas, se ha propuesto como una molécula de señalización de la deficiencia de Fe. En plantas de maíz con una mutación en la absorción de Fe, el NO puede revertir la clorosis (Graziano *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que NO estabiliza la abundancia de la proteína FIT. La aplicación de inhibidores de FIT causó un decremento en los niveles y la actividad de la proteína FIT (Meiser *et al.*, 2011).

Recientemente Kobayashi et al., (2016), utilizando plantas de arroz, colocadas en condiciones de deficiencia de hierro, mostraron que varios genes inducidos por jasmonato también son regulados negativamente por las ubiquitina ligasas “Hemerythrin motif-containing really interesting new gene (RING)-and zinc-finger protein 1/2” (*OsHRZ1/2*) y regulados positivamente por los factores de transcripción *IDEF1*. Adicionalmente, observaron un incremento en el contenido de ácido jasmónico en plantas transgénicas silenciadas en la expresión de *OsHRZ1* (*iHRZ1*) en condiciones de suficiencia de hierro y que, en plantas no transgénicas, la deficiencia de hierro *per se*, aumentaba la síntesis de dicha fitohormona, por lo cual se propone, que en estas condiciones, dicha fitohormona induce la expresión de *IDEF1*, el cual a su vez aumenta la síntesis de esta y por tanto, se incrementa la expresión de los genes involucrados en la toma y translocación de hierro.

En nuestro grupo de trabajo, Raya-González et al., (2016) observaron en plantas de *A. thaliana*, que el VOC dimetilhexadecilamina producido por la PGPR *A. agilis* UMCV2 induce la expresión del gen de síntesis de jasmonato, *LOX2* y que en plantas mutantes en la conjugación (*jar1*), percepción (*coi1-1*) y en la expresión de genes de respuesta a esta fitohormona (*myc2*), no se presenta el fenotipo característico de las plantas sometidas a dimetilhexadecilamina.

### **3.6.2 Regulación de la respuesta a deficiencia de hierro por sacarosa**

Numerosos estudios han demostrado que la sacarosa regula la biosíntesis, transporte y metabolismo de las auxinas (Meir et al., 1985), adicionalmente, el aumento de dióxido de carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>), aumenta la producción de sacarosa y a su vez, la actividad FCR y la expresión de *FER*, *LeFRO1* y *LeIRT1* en raíces de tomate deficientes de hierro (Jin et al., 2009). Con la finalidad de demostrar que la sacarosa actúa río arriba de las auxinas para modular la respuesta a deficiencia de hierro en plantas estrategia I, Yong et al., (2016), investigaron el efecto de la deficiencia de hierro en los niveles de sacarosa en raíces de *A. thaliana*. Se observó que, a 12 horas del tratamiento con deficiencia de hierro, los niveles de sacarosa incrementaron; este incremento fue progresivo después de 12 horas, lo cual indica que la acumulación de sacarosa incrementa de manera específica en

deficiencia de hierro. Posteriormente, los autores estudiaron el efecto de la sacarosa exógena sobre la actividad FCR, encontrando que 2 mM de sacarosa fue suficiente para aumentar la actividad FCR. La aplicación de sacarosa también aumentó el contenido de clorofila en deficiencia de hierro, la concentración de hierro en raíz y parte aérea. En plantas transgénicas sobreacumuladoras de sacarosa que portaban la construcción *35S::SUC2*, se observó mediante PCR en tiempo real que la expresión del gen *FIT* aumentó significativamente respecto al control, mientras que en plantas silvestres Col-0 en deficiencia de hierro y con sacarosa exógena, la expresión de los genes *FRO2* e *IRT1* aumentó de manera significativa respecto al control y al tratamiento con deficiencia de hierro. Sin embargo, la aplicación de sacarosa fue incapaz de recuperar la expresión de *FRO2* e *IRT2* en mutantes *fit*. Por tanto, se concluye que la sacarosa confiere resistencia a deficiencia de hierro vía la inducción de la actividad férricoquelato reductasa dependiente de FIT.

### **3.7 Rizobacterias que facilitan la absorción de hierro**

Además de las estrategias, las fitohormonas y la sacarosa utilizadas por las plantas para la toma de hierro, existen microorganismos en la rizosfera conocidos como PGPRs, con funciones centrales en la mineralización y transformación de nutrientes que ayudan a las plantas en la toma de dicho metal (Marschner *et al.*, 2011). Estos microorganismos secretan moléculas con capacidades quelantes, reductoras y oxidantes. Sin embargo, las actividades de los microorganismos en el suelo están restringidas por la disponibilidad de las fuentes de carbono (De Nobili *et al.*, 2001), por lo tanto, los exudados de las plantas representan una fuente de carbono accesible para las bacterias del suelo (Badri *et al.*, 2009).

Las plantas que experimentan deficiencia de hierro, además de inducir cambios morfológicos y modificaciones fisiológicas en su sistema radicular, incrementan no sólo la cantidad, sino la complejidad de las moléculas que liberan al medio (Hinsinger *et al.*, 2003). Uno de los aspectos mejor estudiados de la interacción planta-bacteria es su capacidad para inducir efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas y aumentar la toma de nutrientes. Las rizobacterias aumentan la movilidad de Fe mediante la liberación sideróforos (Saha *et al.*, 2013). La comunidad

de microorganismos en la rizosfera cambia con el estado de hierro de las plantas. La proporción de microorganismos productores de sideróforos aislados de suelos incubados con exudados de las raíces de plantas deficientes de hierro, es más alta que en suelos controles (Jin *et al.*, 2010). En conclusión, las plantas deficientes de hierro, inducen cambios en la estructura de la comunidad microbiana de la rizosfera que favorecen la toma de hierro por parte de la planta.

### **3.7.1 Las rizobacterias modulan la resistencia a estrés salino**

Las PGPRs, además de suprimir enfermedades causadas por patógenos a través cambios físicos y químicos relacionados a la defensa de la planta (Sarma *et al.*, 2012) en un proceso conocido como Resistencia Sistémica Inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (Van Loon *et al.*, 1998), aumentan la tolerancia de las plantas al estrés abiótico como sequía, salinidad y altas o bajas temperaturas (Yang *et al.*, 2009), este fenómeno se conoce como Tolerancia Sistémica Inducida (IST, por sus siglas en inglés) (Bakker *et al.*, 2007).

La salinidad del suelo es un problema serio para el rendimiento de los cultivos, debido a que las tierras cultivables están siendo afectadas por este tipo de estrés (Rengasamy, 2006). Las PGPRs con capacidad de inducir ISR en las plantas, tienen el potencial para inducir IST, debido a que algunos de los genes involucrados en la defensa (genes de la vía de etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico son comunes con los genes expresados en situaciones de estrés salino (Cheong *et al.*, 2002). Zhang *et al.*, (2008), observaron que la bacteria *Bacillus subtilis* GB03 confiere tolerancia salina en *A. thaliana* por regulación tejida específica de “*high-affinity K<sup>+</sup> transporter*” (*HKT1*). GB03 bajo estrés salino baja la expresión de *HKT1* en raíces y la aumenta en parte aérea, lo cual resulta en baja acumulación de Na<sup>+</sup> a través de la planta, comparada con los controles. Barriuso *et al.*, (2008) utilizaron 4 cepas de PGPRs para inducir resistencia sistémica en *A. thaliana* Col 0 contra estrés salino y encontraron que la cepa *Bacillus*. sp. L81 y *Arthrobacter oxidans* BB1 reducen significativamente la mortalidad de la planta debida a estrés salino. También mostraron que la vía dependiente de ácido salicílico estaba involucrada en la defensa inducida por L81 y BB1, debido al aumento en la expresión del gen

“*Pathogenesis Related 1*” (*PR1*) asociado a dicha vía. En otro experimento, Han y Lee, (2005), observaron que la inoculación de 2 PGPRs, *Serratia proteamaculans* ATCC 3547 y *Rhizobium leguminosarum* 128C56G erradicó los efectos de la salinidad sobre enzimas antioxidantes, fotosíntesis, contenido de minerales y crecimiento en *L. sativa* crecida en suelo salino.

### **3.7.2 Los VOCs producidos por las PGPRs incrementan la expresión de genes de respuesta a deficiencia de hierro en plantas**

La bacteria PGPR, *Bacillus subtilis* GB03 emite una mezcla de VOCs que activan la promoción del crecimiento en *A. thaliana* (Ryu *et al.*, 2003). Debido a que esta mezcla de VOCs aumenta la maquinaria fotosintética (Zhang *et al.*, 2007) y el hierro es fundamental para la fotosíntesis, Zhang *et al.*, (2009), evaluaron la capacidad de *B. subtilis* GB03 para activar la maquinaria de adquisición de hierro en *A. thaliana*. Las plantas y la bacteria fueron crecidas en cajas Petri divididas (las plantas en medio MS y la bacteria en agar soya) para evitar el contacto directo y promover la interacción a través de VOCS. La presencia de los VOCs de *B. subtilis* GB03, aumentó de manera progresiva la actividad FCR en condiciones de hierro suficiente, al igual que aumentó el contenido de clorofila. Adicionalmente, los VOCs de GB03 causaron la acidificación de la rizosfera mediante el aumento en la liberación de protones. Mediante PCR en tiempo real, se observó un aumento significativo respecto al control en la expresión de los genes *FRO2* e *IRT1* necesarios para la toma de hierro. En mutantes con pérdida de función, *fit1-2*, no se observó efecto de los VOCS de GB03 sobre la asimilación de hierro y eficacia fotosintética. Estos resultados demostraron el potencial de las bacterias para controlar la adquisición de hierro en plantas.

En nuestro grupo de trabajo se observó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de *Arthrobacter. agilis* UMCV2 y la dimetilhexadecilamina (DMHDA) sobre la expresión génica de los *MtFROs* de *M. truncatula*. Al analizar la expresión de los genes mediante qRT-PCR, se determinó que los genes *MtFRO1*,

*MtFRO3*, *MtFRO4*, *MtFRO5* de parte aérea y el gen *MtFRO5* de raíz, incrementaron su expresión en presencia de la bacteria *A. agilis* UMCV2 en condiciones de deficiencia de hierro, mientras que los genes *MtFRO1*, *MtFRO3*, *MtFRO4* y *MtFRO6* de raíz y el gen *MtFRO6* de parte aérea presentaron mayor nivel de expresión en presencia de la DMHDA en condiciones de deficiencia de hierro (Montejano-Ramírez, 2014).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, Castulo *et al.*, (2015), analizaron la expresión del gen *SbFRO1* utilizando PCR en tiempo real y encontraron que la expresión de dicho gen fue modulada por los compuestos orgánicos volátiles producidos por *A. agilis*, específicamente la dimetilhexadecilamina, lo cual indica que los VOCs de *A. agilis* UMCV2 también presentan efecto de aumento de expresión en genes *FRO* de plantas estrategia II.

### **3.7.3 Interacción entre los mecanismos de defensa inducidos por bacterias y el proceso de toma de hierro en plantas.**

En un modelo propuesto por Mohamed *et al.*, (2013), se indica que los VOCs producidos por las PGPRs aumentan la síntesis de ácido salicílico y ácido jasmónico, lo cual, a su vez, induce la expresión de los genes *PR1* y *DEF*, disparando las respuestas SAR e ISR relativamente. Adicional a la activación de las vías de resistencia sistémica, dichos VOCs, aumentan la tolerancia de las plantas al estrés abiótico, incluyendo la deficiencia de hierro. La presencia de los VOCs induce la expresión del factor de transcripción *FIT*, aumentando la expresión de los genes *FRO* e *IRT* para favorecer la toma de hierro. Por lo anterior, en dicho modelo, se indica que tanto el establecimiento de las respuestas de defensa como la inducción de los genes para toma de hierro, ocurren de manera simultánea en la planta por la presencia de PGPRs.

Posteriormente, Koen *et al.*, (2014), observaron que la deficiencia de hierro en plantas de *A. thaliana*, induce la expresión de los genes *PR1* y *DEF1.2* y que dicha

inducción se presentó aún en estadios transitorios de deficiencia de dicho metal, siendo mayor que en presencia de ácido  $\beta$  aminobutírico, el cual se sabe, induce la resistencia de las plantas tanto a estrés biótico como abiótico. El aumento en la expresión de los genes de defensa, fue aditivo en presencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y en condiciones de deficiencia de hierro. Con base en estos resultados, los autores concluyen que la deficiencia de hierro coloca a la planta en un estado de defensa, reforzando así, su resistencia a futuros ataques por microorganismos fitopatógenos.

Zamioudis *et al.*, (2015) demostraron que los VOCs producidos por la bacteria inductora de ISR *Pseudomonas simiae* WCS417 aumentan la expresión de los genes FRO2 e *IRT* de *A. thaliana* y son inductores del factor de transcripción MYB72, necesario para el establecimiento de ISR. MYB72 aumenta su expresión en deficiencia de hierro, y está involucrado en la respuesta a deficiencia de dicho metal modulando la expresión de genes para la síntesis de compuestos fenólicos. En respuesta al tratamiento con VOCs, MYB72 se coexpresa con los genes relacionados a la toma de hierro, FRO2 e *IRT1* de forma dependiente de *FIT*. Los resultados resaltan la función de MYB72 en el establecimiento de ISR y la activación de la maquinaria de toma de hierro en las plantas hospederas e involucran elementos de la defensa de plantas en el proceso de absorción de hierro.

En *M. truncatula* se han identificado genes de defensa: *PR1* mediador de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y *DEF 1* y *2* mediadores de ISR. Peleg-Grossman *et al.*, (2012), analizaron la función de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) sobre la expresión de genes de defensa *PR1* en *M. truncatula* durante simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* y patogénesis por *Pseudomonas putida*. Los autores demostraron que la producción de ROS es más fuerte y larga durante las interacciones simbióticas en comparación con interacciones patógenas. El aumento en la acumulación de ROS, por adición de  $H_2O_2$  redujo la expresión del gen *PR1* mientras que la catalasa tuvo un efecto opuesto, estableciendo que la expresión de dicho gen es opuesta a los niveles

citoplásmicos de ROS. Adicionalmente Hanks *et al.*, (2005) identificaron dos defensinas (DEF1 y DEF2) en *M. truncatula*. Análisis *in silico*, así como Northern blot y RT-PCR indicaron que los genes *DEF1* y *DEF2* se expresan en varios órganos, incluyendo hojas, flores, vainas, semillas maduras y raíces. No obstante, lo anterior, no se ha demostrado que dichos genes estén involucrados en las respuestas a deficiencia de hierro.

Debido a los antecedentes que existen en nuestro grupo de trabajo sobre hierro y genes *FRO* en *M. truncatula* y a la presencia de genes relacionados a defensa, esta leguminosa es nuestro modelo de estudio.

### **3.8 Características generales de *Medicago truncatula*.**

*M. truncatula* es una especie anual, importante en el sur de Australia: proporciona alimento para el ganado, así como también beneficia la fertilidad del suelo a través de la fijación de nitrógeno. *M. truncatula* presenta características ventajosas, tales como tamaño pequeño, tiempo de generación corto y autofertilización. Es una planta diploide, tiene un genoma relativamente pequeño, con un total de 500-550Mbp, características que la hacen un modelo biológico adecuado para estudios en laboratorio (Bell *et al.*, 2000).

*M. truncatula* se compone de un eje principal que se puede organizar ya sea en una roseta (es decir, las hojas están en el nivel del cuello con entrenudos muy cortos) o como un eje alargado, y ramas de diferentes órdenes (por ejemplo, primarias, secundarias, terciarias). La Morfología y arquitectura de la planta, varía fuertemente entre los genotipos y son muy dependientes del ambiente y sus condiciones (Aitken, 1955).

Cada eje en una planta se compone de fitómeros. Un fitómero es la unidad elemental funcional de un eje (Lecoeur, 2005): Tanto para *M. truncatula*, como para los chícharos un fitómero se compone de:

- Un entrenudo (sección de tallo entre dos nodos adyacentes): la longitud de los entrenudos puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales y de acuerdo a los ejes. En *M. truncatula*, los entrenudos son angulares;
- Una hoja: a excepción de la primera hoja verdadera que es unifoliada, las hojas de *M. truncatula* son trifoliadas. Cada hoja se compone de un pecíolo; tres folíolos que son dentados y con pelos en su parte superior, a veces con una mancha oscura en el centro y dos estípulas basales (excrecencias cargadas en cada lado de la base del pecíolo), cuya función es proteger la yema axilar.
- Un meristemo axilar, capaz de producir ramas (si el fitómero que lleva el meristemo axilar ha aparecido antes de la formación de las flores) u órganos reproductivos (si el fitómero que tiene el meristemo axilar ha aparecido después de la formación de las flores).

La germinación de *M. truncatula* es epigea (los cotiledones se expanden sobre el suelo). Una vez que los cotiledones emergen, las hojas que se producen por lo general se organizan en una roseta que es el eje principal de la planta. Las hojas que se producen son entonces organizadas en una filotaxia alternada (dos hojas sucesivas son acomodadas alternadamente a uno y otro lado del axis) (Moreau, 2006).

Durante el desarrollo de la planta, las ramas primarias se desarrollan en la axila de las hojas del eje principal. La rama primaria se forma de la axila de la primera hoja del eje principal desarrollada (la hoja unifoliada). Después, aparecen sucesivamente las otras ramas primarias, a partir de la axila de la que se desarrollan. Puesto que cada rama primaria se desarrolla de la axila de una hoja del eje principal, la disposición de las ramas primarias en la planta es parecida a la filotaxia del eje principal. Las ramas secundarias y terciarias generalmente se desarrollan en la axila de las hojas de las ramas primarias y secundarias respectivamente. Las ramas cotiledonares también se pueden formar en la axila de los cotiledones. Las ramas tienen una filotaxia discontinua, pero, debido a torsión

de los ejes, dos hojas sucesivas pueden estar situadas en el mismo lado (Moreau, 2006).

*M. truncatula* muestra un crecimiento indeterminado, dando lugar a un período prolongado de producción de flores y semillas después de desarrollar el meristemo de la inflorescencia primaria. La planta es autógama y las semillas son autofertilizadas de manera eficiente en ausencia de polinización de insectos (Gallardo *et al*, 2006).

Posee pequeños racimos de inflorescencias, los cuales llevan de 1 a 5 flores amarillas de 5-8 mm de longitud. Las flores contienen 10 óvulos y únicamente abren después de que su polen ha fertilizado sus óvulos. La semilla es de color marrón claro arriñonada. Las flores poseen un “mecanismo tripping”, que es una característica floral compartida en todo el género *Medicago* (Lesins y Lesins, 2012).

#### 4 JUSTIFICACIÓN

La planta *M. truncatula* cuenta con 6 genes *FRO* reportados. Se sabe que los compuestos orgánicos volátiles de la bacteria *A. agilis* UMCV2, modulan la expresión de los genes *FRO* de dicha planta, siendo el efecto aditivo en condiciones de deficiencia de hierro. Sin embargo, se desconoce si el efecto es similar a nivel órgano específico. Adicionalmente, existen reportes que indican que tanto la deficiencia de hierro como la presencia de un microorganismo patógeno, inducen la expresión de los genes marcadores de las vías de resistencia sistémica en plantas y que la inducción es mayor cuando se combinan ambas condiciones.

Por lo anterior, es importante conocer si *A. agilis* UMCV2 incrementa la transcripción de los genes *FRO* en los distintos órganos de *M. truncatula* e induce la expresión de los elementos de las vías de resistencia sistémica de dicha planta, teniendo un efecto mayor en deficiencia de hierro.

## 5. HIPÓTESIS

*A. agilis* UMCV2 aumenta la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula*, en condiciones de deficiencia como de suficiencia de hierro, de la misma manera que induce los elementos de las vías de resistencia sistémica de la planta.

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la bacteria *A. agilis* UMCV2 en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, sobre la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula* y genes marcadores de las vías de resistencia sistémica de la planta.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un escrutinio *in silico* de la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula*.
- Determinar la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula* en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro.
- Determinar la modificación de la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula* por efecto de *A. agilis* UMCV2 en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro.
- Evaluar el efecto de la bacteria *A. agilis* UMCV2 en los genes marcadores de resistencia sistémica en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Escrutinio *in silico* de la expresión órgano específica de los genes

#### *MtFRO*

Se obtuvieron las secuencias de oligonucleótidos de los genes *MtFRO* en secuencia FASTA. Posteriormente, se realizó un blast con dichas secuencias en la base de datos “*Medicago truncatula Gene Expression Atlas*” (MtGEA) ([http://mtgea.noble.org/v3/blast\\_search\\_form.php](http://mtgea.noble.org/v3/blast_search_form.php)) usando la opción “*Chip Target*” y se seleccionó la sonda con la puntuación más alta. Finalmente, se efectuó un análisis de coexpresión en los órganos de interés (raíz, tallo, hoja, flor y vaina) con las sondas obtenidas de un análisis utilizando la herramienta “*Basic Local Alignment Search Tool*” (blast), correspondientes a cada gen.

### 6.2 Condiciones de crecimiento de las plantas de *Medicago truncatula*

Se utilizaron plantas de *M. truncatula* ecotipo Jemalong A17. Las semillas fueron sumergidas en un tubo vial con 1 ml de ácido sulfúrico y se agitaron constantemente hasta la aparición de pequeños puntos negros en el tegumento (8 min aproximadamente). El exceso de ácido fue removido y las semillas fueron enjuagadas 7 veces con agua desionizada estéril. La esterilización se llevó a cabo con una solución de hipoclorito de sodio 12% durante 2 min. Posteriormente, las semillas se enjuagaron 5 veces con agua desionizada estéril. Las semillas fueron germinadas en cajas Petri con medio Murashige Skoog (MS) y transferidas a condiciones de invernadero en macetas con sustrato estéril (esterilizado dos veces en olla de presión, durante 1 horas) 5 días después de su germinación. Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con agua desionizada y una vez por semana con Hoagland para aplicar el tratamiento de suficiencia o deficiencia de hierro.

### 6.3 Preparación del medio MS

El medio MS se preparó de la siguiente manera: en 1 L de agua se agregó 1 ml de solución stock 1 (25 g de CaCl<sub>2</sub>), 10 ml de solución stock 2 (9.25 g de MgSO<sub>2</sub> y 4.25 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5 ml de solución stock 3 (0.5 g de FeSO<sub>4</sub> y 0.7 g de NaEDTA), 1 ml de solución stock 4 (1.69 g de MnSO<sub>4</sub>, 1.05 g de ZnSO<sub>4</sub>, 0.62 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.83 g de KI, 0.025 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.0025 g de CuSO<sub>4</sub> y 0.0025 g CoCl<sub>2</sub>), 10 ml de solución stock 5 (0.5 g de glicina, 0.0125 g de piridoxina, 0.025 g de Ac. Nicotínico, 0.0025 g de Tiamina y 1.5 g de Myo-inositol) y 10 ml de solución stock 6 (41.25g de NH<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> y 47.5 g KNO<sub>3</sub>). Posteriormente el pH del medio MS se ajustó a 6.5. Finalmente, el medio se esterilizó durante 20 minutos.

### 6.4 Preparación de Hoagland

Se preparó un stock 10 x de Hogland a 20 µM de Fe, utilizando el siguiente protocolo: en 1 L de agua desionizada se agregaron 10.2 gr de KNO<sub>3</sub>, 4.92 gr de Ca (No<sub>3</sub>), 2.3 gr de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 4.9 gr de MgSO<sub>4</sub>, 28.6 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 18.1 mg de MnCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0.6 mg de CUSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, 2.2 mg Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, 0.9 mg de NaMoO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O y 0.6 ml de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O al 0.5%. El Hoagland se usó a 1 x, para lo cual se agregaron 100 ml de Hogland 10 x en 900 ml de agua desionizada y se ajustó el pH a 6.5. Para la solución 1 x con hierro deficiente, se omitió la adición de 0.6 ml de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O al 0.5%.

### 6.5 Inóculo de la bacteria *A. agilis* UMCV2

De un cultivo previo de *A. agilis* UMCV2, con 48 horas de crecimiento en caja Petri, se tomó el estriado con un asa de henle y se colocó en un vial de 50 ml con 3 ml de agua desdionizada estéril para homogenizar. En una celda de cuarzo, se colocó 1 ml del homogeneizado contenida en el tubo falcón, se leyó a 595 nm en el espectrofotómetro. Se utilizó la fórmula  $V_1 = C_2V_2/C_1$  para dejar el inóculo a una densidad óptica final de 0.1 (1x10<sup>7</sup> UFC).

## **6.6 Inducción de la expresión de los genes *MtFRO***

Se colocaron 3 plantas por maceta en condiciones de invernadero, teniéndose 3 macetas por tratamiento (9 plantas). Los tratamientos correspondían a suficiencia de hierro (Fe+), suficiencia de hierro con *A. agilis* UMCV2 (UMCV2Fe+), deficiencia de hierro (Fe-) y deficiencia de hierro con *A. agilis* UMCV2 (UMCV2Fe-). A los 15 días, las plantas fueron inoculadas en la raíz por pipeteo, con 1 ml de *A. agilis* UMCV2. Se realizaron tres inoculaciones más, una cada 15 días. Las plantas fueron crecidas hasta la aparición de vainas (5 meses).

## **6.7 Cuantificación de clorofila**

Para la cuantificación de clorofila se usó un medidor de clorofila "OPTI-SCIENCES CCM-200®". Se tomaron 3 lecturas de cada hoja para un resultado de mayor exactitud.

## **6.8 Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó en muestras compuestas (mezcla del órgano de interés de las 3 plantas de cada maceta, por tratamiento) en raíces, tallos, hojas, flores y vainas. El proceso de extracción de RNA fue el siguiente: las muestras se molieron con nitrógeno líquido y se transfirieron a viales que contenían 500 µl de trizol (Sigma-Aldrich) previamente enfriados en hielo. Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de TRIzol y se agitó vigorosamente por con la mano por 15 segundos. Las muestras fueron incubadas por 3 min a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 12, 000 G por 15 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de isopropanol. Las muestras se mezclaron por inversión y se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos, tiempo tras el cual fueron centrifugadas a 12,000 G por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla que contiene el ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se mezcló cuidadosamente en vórtex y se centrifugó 5 minutos a 7,500 g a 4°C. La

pastilla se dejó secar al aire por 10 minutos y fue resuspendida en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O dde. Finalmente se procedió a dar el tratamiento con DNasa y se corrió en gel de agarosa 1%, a 90 V para corroborar su integridad.

### **6.9 Tratamiento con DNasa**

A los 50  $\mu$ l de RNA, se les agregó 5  $\mu$ l del buffer de reacción 10X DNasa I, 4.5  $\mu$ l de agua DEPC y 0.5  $\mu$ l de la enzima DNasa I. La mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la enzima se inactivó por adición de 1  $\mu$ l de EDTA 25 mM. Finalmente, la muestra se calentó 10 min a 65°C y se procedió a la cuantificación de RNA.

### **6.10 Esterilización de la cámara de electroforesis**

Los peines y la cámara de electroforesis se esterilizaron con Benzal al 10% y posteriormente se enjuagó con H<sub>2</sub>O dde 3 veces.

### **6.11 Cuantificación de RNA**

Las muestras fueron cuantificadas por triplicado en un nanodrop Thermo Scientific™, agregando 1.5  $\mu$ l de cada muestra para la lectura.

### **6.12 Síntesis de cDNA usando Oligo (dT)**

La síntesis de cDNA, se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR”.

### 6.13 Reacción de PCR

Se utilizó cDNA de cada órgano de interés para cada tratamiento por triplicado y para llevar a cabo la reacción de PCR en un termociclador iCycler™, con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización inicial a 95 °C por 1 ciclo por 3 min, 35 ciclos de amplificación con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 1 min, temperatura de alineamiento de 60°C por 1 min y una extensión a 72°C por 2 min y finalmente, 1 ciclo para una extensión final a 72°C por 5 min. Se utilizaron 10 µl de la enzima GoTaq Master Mixes (Promega), 1 µl del oligo Forward, 1 µl del oligo Reverse, 1 µl de cDNA (4 ng) y 7 µl de agua desionizada esteril. Se utilizaron los oligos diseñados por Orzco-Mosqueda et al., (2012) para la amplificación de los genes *MtFRO* y *MtActina*. Adicionalmente, se diseñaron oligos para amplificar el gen *MtFRO2* (F' ACTATGCAGGCTCTTGCAGC y R' TAATCCAATCCCGCCCGAAC) Los productos de la amplificación fueron corridos en gel de agarosa al 1%, a 95 V.

### 6.14 Reacción de PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo por triplicado para cada órgano y para cada gen, en cada tratamiento en un termociclador ABI The StepOne™ System de Applied Biosystems. Adicionalmente, se llevó a acaba la reacción qPCR con cDNA de hojas de cada tratamiento, por triplicado, para genes de la vía SAR e ISR, usando los siguientes oligos: *MtPR1* F' ACTTTAATACACACACCCATTTGC y R' TCAGTTAAGATCTAGAGTCCCACA; *MtDEF2* F' ACT TTA ATA CAC ACA CCC ATT TGC y R' TCA GTT AAG ATC TAG AGT CCC ACA. El cDNA fue diluido 1:5 para realizar curva estándar de los genes *MtFRO2*, *MtPR1* y *MtDEF2*. Las reacciones de qPCR se realizaron con el kit de SYBR-Green (Applied Biosystems) usando el siguiente protocolo: 10 µl de SYBR-Green, 1 µl de los oligos Forward y Reverse, 1 µl de cDNA y 7 µl de agua. Las muestras se corrieron a 95°C por 4 min, seguido de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg por 40 ciclos. Para elaborar la curva de melting, las muestras se corrieron a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y posteriormente la temperatura fue elevada a 95°C

a una proporción de 0.3°C/s. La expresión de los genes *MtFRO* se evaluó utilizando el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ .

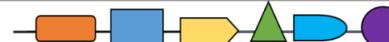
### **.6.15 Análisis estadísticos**

Los resultados fueron analizados usando Statistica 7.0. La prueba de *t* de Student fue usada para comparar grupos (expresión de los genes *MtFRO*) y la prueba de ANOVA y Duncan fue usada para comparaciones múltiples (clorofila) ( $p < 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características generales de los genes *MtFRO*

El servidor web MtGEA, proporciona información relacionada con los genes de interés (anotaciones GO y dominios). De acuerdo con los resultados, los genes *MtFRO1*, *MtFRO2*, *MtFRO3*, *MtFRO4* y *MtFRO5*, tienen función férrico quelato reductasa, además de presentar los motivos de unión a FAD, NADPH y férrico reductasa característicos de éstos. Interesantemente, el gen *MtFRO6* es descrito como una "Respiratory burst oxidase homolog protein B" en el servidor MTGEA, sin embargo, al igual que el resto de los genes *MtFRO*, contiene los dominios característicos de éstos (Tabla 1).

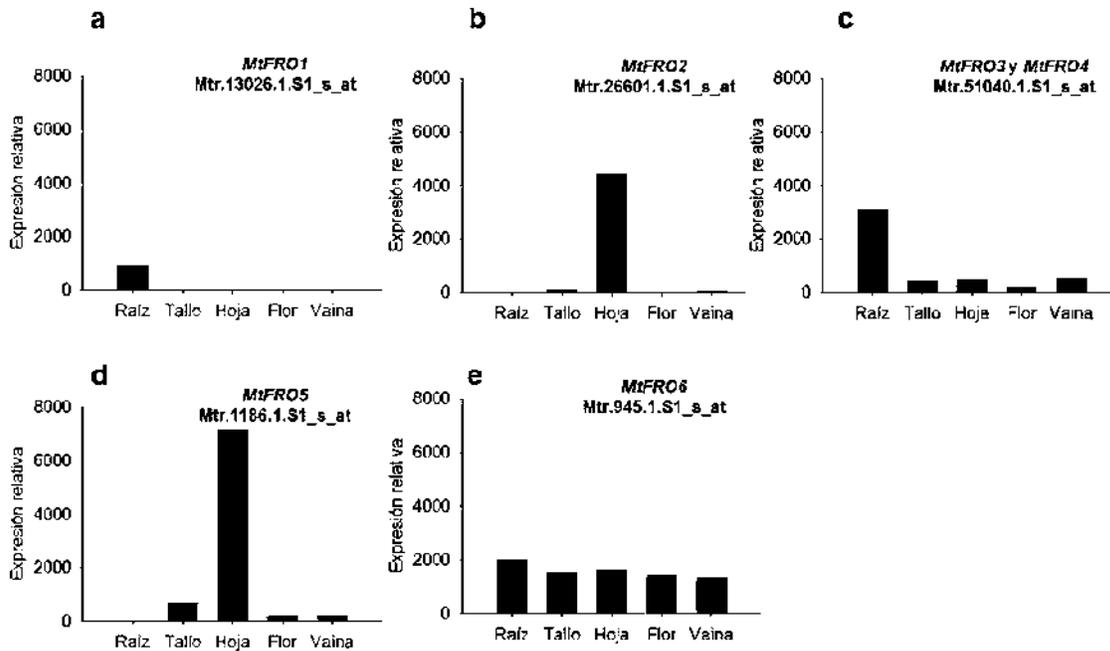
Gen	Anotaciones GO	Dominios
<i>MtFRO1</i>	Actividad férrico quelato reductasa y transporte de hierro quelado	
<i>MtFRO2</i>	Actividad férrico quelato reductasa, transporte de electrones, respuesta a estímulos de luz y actividad óxidoreductasa	
<i>MtFRO3</i>	Actividad férrico quelato reductasa, unión de iones de calcio, transporte de hierro quelado, complejo de NADPH oxidasa, unión a FAD y a NADPH	
<i>MtFRO4</i>	Actividad férrico quelato reductasa, unión de iones de calcio, transporte de hierro quelado, complejo de NADPH oxidasa, unión a FAD y a NADPH	
<i>MtFRO5</i>	Actividad férrico quelato reductasa, actividad óxidoreductasa, transporte de electrones, liberación de superóxido	
<i>MtFRO6</i>	Proceso metabólico en oxígeno y especies reactivas de oxígeno, actividad NADPH, vía de señalización mediada por citocinina	

-  Unión a FAD
-  Férrico reductasa
-  Unión a NADPH
-  Componente de transmembrana similar a férrico quelato reductasa
-  Unión a FAD similar a ferredoxina reductasa
-  Barril beta similar a riboflavina sintasa

**Tabla 1. Características generales de los genes *MtFRO*.** El servidor web MTGEA indica mediante anotaciones Go, las posibles funciones de los genes de interés; así, como los dominios de la proteína.

### 7.1.1 Expresión órgano específica *in silico* de los genes *MtFRO*

Con la finalidad de evaluar si la expresión de los genes *MtFRO* es órgano específica, se realizó un análisis *in silico* en la plataforma web "*Medicago truncatula Gene Expression Atlas*" (MtGEA) con las secuencias de oligonucleótidos de dichos genes (Fig. 5). Se obtuvieron las sondas para cada gen *MtFRO* mediante un blast. Las sondas fueron usadas para realizar un análisis de multitranscrito en raíz, tallo, hoja, flor y vaina de los genes *MtFRO*. Se observó que el gen *MtFRO1* se expresa en raíz, debido a la abundancia transcripcional presente en dicho órgano y a la ausencia de transcrito el resto de los órganos (Fig. 5a). El gen *MtFRO2* Se expresa principalmente en hoja por el alto grado de transcrito presente en este órgano, pero se considera que tiene una expresión basal en tallo, debido a la presencia de transcrito en este órgano (Fig. 5b). Los genes *MtFRO3* y *MtFRO4* se incluyen en la misma sonda debido a que presentan un 50% de cobertura de secuencia y un 94% de identidad; estos genes mostraron un mayor contenido de transcrito en raíz, sin embargo, también presentan expresión basal en tallo, hoja, flor y vaina (Fig. 5c). Adicionalmente, el gen *MtFRO5* mostró una muy alta expresión relativa en hoja, no obstante, también mostró niveles de expresión en tallo, flor y vaina (Fig. 5d). Finalmente, el gen *MtFRO6* se expresa en todos los órganos, por lo que se considera un gen universal (Fig. 5e). De acuerdo con el escrutinio *in silico*, los genes *MtFRO* tiene un patrón de expresión órgano específica en la planta *M. truncatula*.

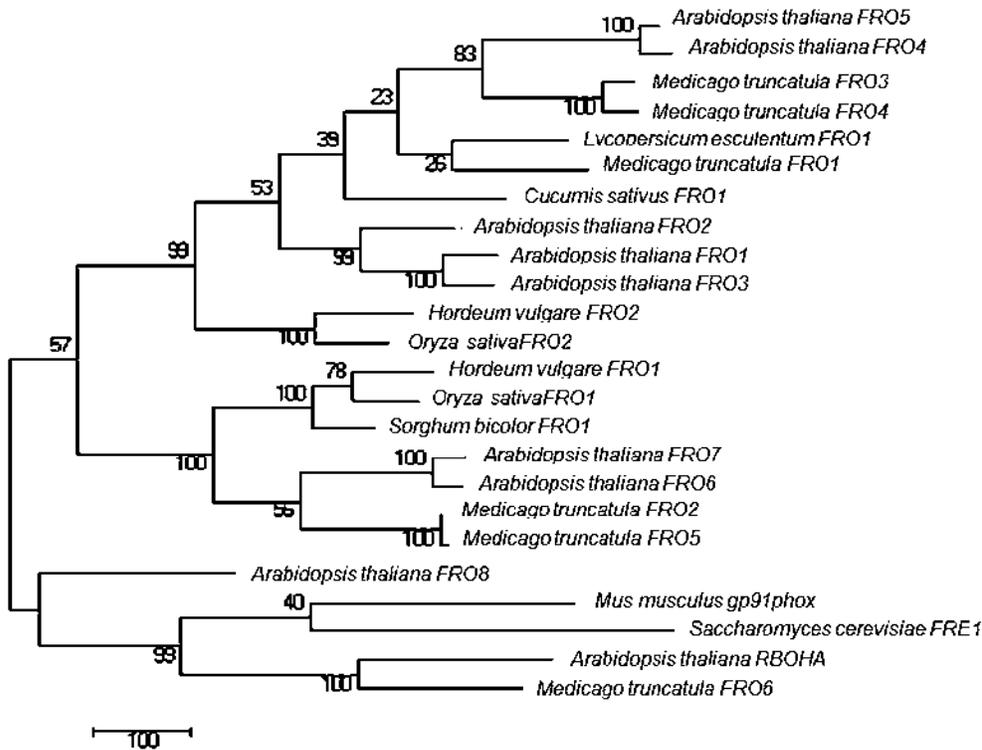


**Fig. 5. Análisis *in silico* de la expresión órgano específica de los genes *MtFRO*.** Los análisis de expresión se realizaron en la plataforma web, “*Medicago truncatula* Gene Expression Atlas” con las secuencias Fasta de los genes *MtFRO*. a) Expresión relativa del gene *MtFRO1* en los órganos analizados. b) Expresión relativa del gene *MtFRO2* en los órganos analizados. c) Expresión relativa de los genes *MtFRO3* y *MtFRO4* en los órganos analizados. d) Expresión relativa del gene *MtFRO5* en los órganos analizados. e) Expresión relativa del gene *MtFRO6* en los órganos analizados. El número de sonda obtenido del blast se indica en la parte superior.

### 7.1.2 Relaciones filogenéticas de los genes *MtFRO*

Con la finalidad de identificar homologías de los genes *MtFRO* con genes *FRO* previamente reportados, se realizó un árbol filogenético con éstos, empleando el algoritmo de “máxima parsimonia” (Fig. 6). Los resultados forman tres cluster, en el primero de ellos se relacionan los genes *AtFRO5*, *AtFRO4*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, *LsFRO1*, *MtFRO1*, *CsFRO1*, *AtFRO2*, *AtFRO1*, *AtFRO3*, *HvFRO2*, y *OsFRO2*, cuya expresión se localiza en raíz; el segundo cluster relaciona a los genes *HvFRO1*, *OsFRO1*, *SbFRO1*, *AtFRO7*, *AtFRO6*, *MtFRO2* y *MtFRO5*, que se expresan en hoja; el tercer cluster agrupa a los genes *AtFRO8*, *gp91phox*, *FRE1*, *RBOHA* y *MtFRO6* cuya proteína difiere estructuralmente a los genes *FRO*, pero contiene los

motivos para realizar la reducción de hierro. En el segundo cluster, se observa que los genes *MtFRO2* y *MtFRO5* son los más cercanos al gen *AtFRO7*, el cual codifica para una proteína que se localiza en el cloroplasto.



**Fig. 6. Análisis filogenético de los genes *MtFRO*.** Se construyó un árbol filogenético de los genes *MtFRO* y genes *FRO* de diversas especies, empleando el algoritmo de “máxima parsimonia”. Los números de las ramas representan el bootstrap, con base en 1000 repeticiones.

### 7.1.3 Localización subcelular de los genes *MtFRO*

Debido a que, en el árbol filogenético, se observó que los genes *MtFRO2* y *MtFRO5* se relacionan con el gen *AtFRO7* cuya proteína se localiza en el cloroplasto, se ubicó la localización subcelular de éstos en el servidor web ProtComp, utilizando la secuencia de aminoácidos de su proteína (Tabla 2). De acuerdo con la predicción de ProtComp, los genes *MtFRO1*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, *MtFRO5* y *MtFRO6* codifican para proteínas que se localizan en la membrana plasmática lo cual es una característica general de los estos genes. Adicionalmente, el gen *MtFRO2* además, de localizarse en la membrana plasmática, también se encuentra en cloroplasto, realizando posibles funciones de reducción de hierro en dicho organelo.

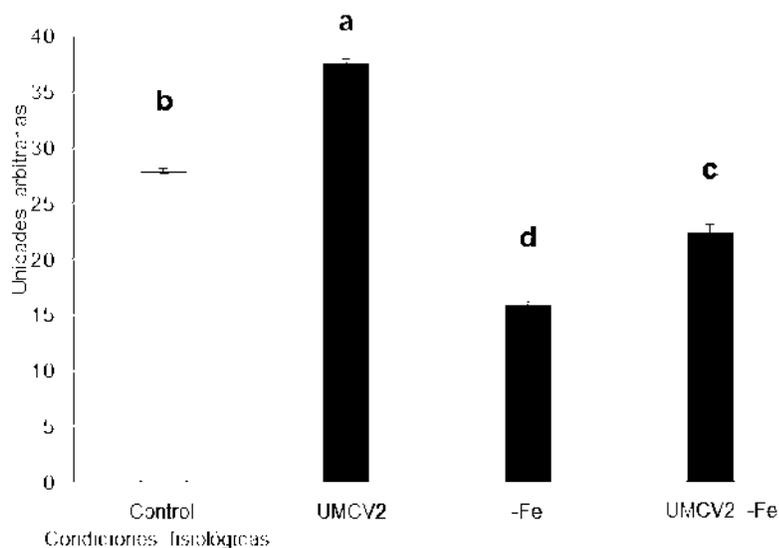
Gen	Localización subcelular	Score
<i>MtFRO1</i>	Membrana plasmática	94
<i>MtFRO2</i>	Membrana plasmática y cloroplasto	90
<i>MtFRO3</i>	Membrana plasmática	88
<i>MtFRO4</i>	Membrana plasmática	77
<i>MtFRO5</i>	Membrana plasmática	62
<i>MtFRO6</i>	Membrana plasmática	51

**Tabla 2. Localización subcelular de los genes *MtFRO*.** Se identificó la localización subcelular de los genes *MtFRO* en el servidor web ProtComp, utilizando la secuencia de aminoácidos de sus proteínas secuencias. Se identificó presencia de todos los genes en la membrana plasmática, sin embargo, el gen *MtFRO2* también se localizó en el cloroplasto.

## 7.2 Análisis de la expresión órgano específica de los genes *MtFRO* mediante PCR

Previo a la extracción de mRNA de plantas de *M. truncatula* deficientes (o no) de Fe e inoculas (o no) con *A. agilis* UMCV2, se realizó la cuantificación de clorofila en plantas de 5 meses de edad, sometidas a dichos tratamientos, empleando a la clorofila como un indicador de la absorción de este micronutriente (Fig. 7). Las plantas inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y en condiciones de suficiencia de hierro, presentaron un aumento en el contenido de clorofila de 9.7 unidades arbitrarias (ua) (aproximadamente un 25%) respecto al control con Fe. La deficiencia de hierro ocasionó una disminución del contenido de clorofila de 11.8 ua (aproximadamente un 40%) respecto al control con Fe, sin embargo, la presencia de la bacteria en esta condición, aumentó el contenido de clorofila 6.4 ua (aproximadamente un 25%) respecto a la condición de deficiencia sin bacteria.

Estos resultados indican que las condiciones de en deficiencia de hierro utilizadas se reflejaron en el estatus nutrimental de la planta, al mostrar valores más bajos de clorofila y que la presencia de la bacteria *A. agilis* UMCV2, aumentó el contenido de ésta tanto en condiciones de suficiencia como deficiencia de hierro.



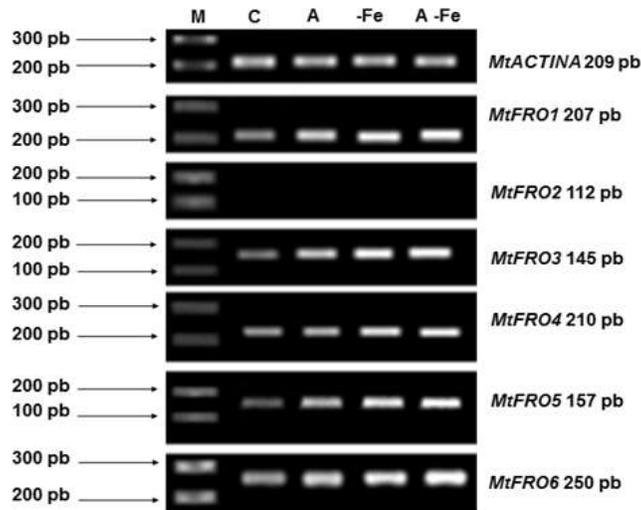
**Fig. 7. Contenido de clorofila en las plantas sometidas a diferentes tratamientos.** El contenido de clorofila fue medido en un foliolo, por triplicado en las nueve plantas de cada tratamiento en plantas de *M. truncatula* de 5 meses. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria. Las letras son usadas para indicar diferencia estadística determinadas por una prueba de rango múltiple de Duncan  $p \leq 0.5$   $n=9$ .

Previo a realizar las reacciones de PCR con cDNA, se probó la calidad de los oligos: se efectuó un control positivo (con DNA, Master Mixer, oligos y agua desionizada estéril) (Fig. 8a) y un control negativo (con Master Mixer, oligos y agua desionizada estéril) (Fig. 8b).



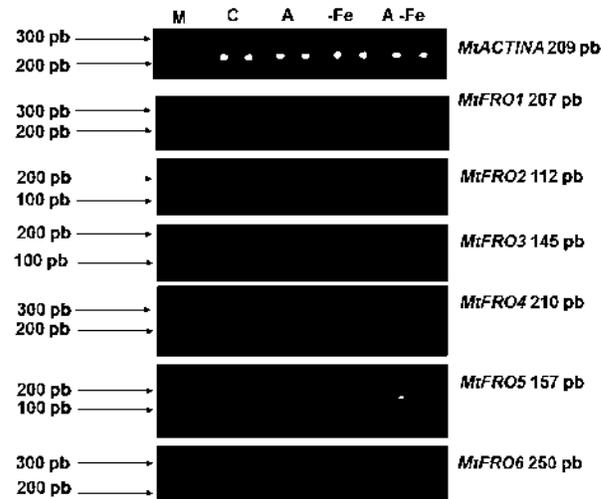
**Fig. 8. Prueba de evaluación de la calidad los oligos.** a) Se extrajo DNA de las plantas de *M. truncatula* y se evaluó la calidad de los oligos mediante PCR. b) No se agregó templado, para evaluar que los oligos no estuvieran contaminados con DNA; se utilizó cDNA para amplificar el gen de actina.

Una vez que se sintetizó el cDNA, se realizaron las reacciones de PCR para evaluar la expresión órgano específica de los genes *MtFRO* en los diferentes órganos de la planta y se cargaron 3  $\mu$ l de reacción en cada pozo del gel de agarosa. De acuerdo con las reacciones de PCR realizadas con cDNA de la raíz (Fig. 8), se observó que los genes que se expresan en este órgano corresponden a *MtFRO1*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, *MtFRO5* y *MtFRO6* (Fig. 9) El aumento en la intensidad de la banda, indica que la expresión de los genes *MtFRO*, aumenta en deficiencia de hierro, respecto al control; sin embargo, la presencia de la bacteria *A. agilis* UMCV2, aumenta la expresión sin importar el estatus nutricional de hierro. Adicionalmente, se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. No existe expresión del gen *MtFRO2* en la raíz debido a la ausencia de banda en el gel.



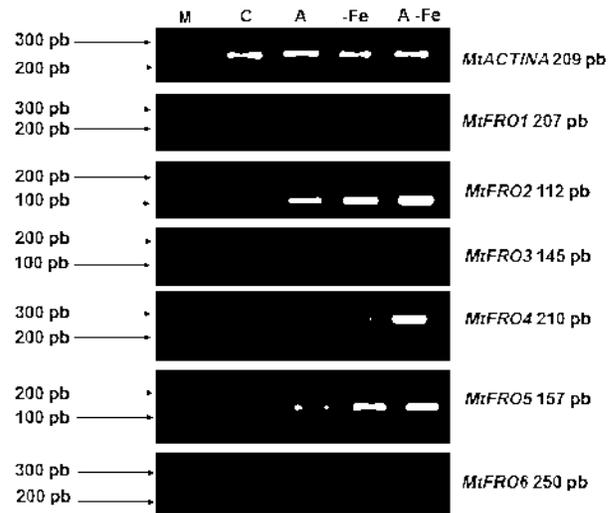
**Fig. 9. Expresión de los genes *FRO* en la raíz de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de raíz se realizaron reacciones de PCR para evaluar la expresión de los genes *MtFRO*. Se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. Las bandas correspondientes a los genes evaluados, se observan en cada tratamiento. La letra M, representa el marcador de peso molecular, C representa la condición control, A indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y A -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

Los experimentos de PCR con cDNA del tallo de *M. truncatula* muestran la expresión del gen *MtFRO5* en dicho órgano (Fig. 10). La expresión del *MtFRO5* aumenta en deficiencia de hierro respecto al control y la inoculación con *A. agilis* UMCV2, aumenta la expresión de este gen, indistintamente del contenido de hierro de la planta. El resto de los genes *FRO* de *M. truncatula* no mostraron expresión en tallo. Se utilizó el gen *MtActina* como control de carga



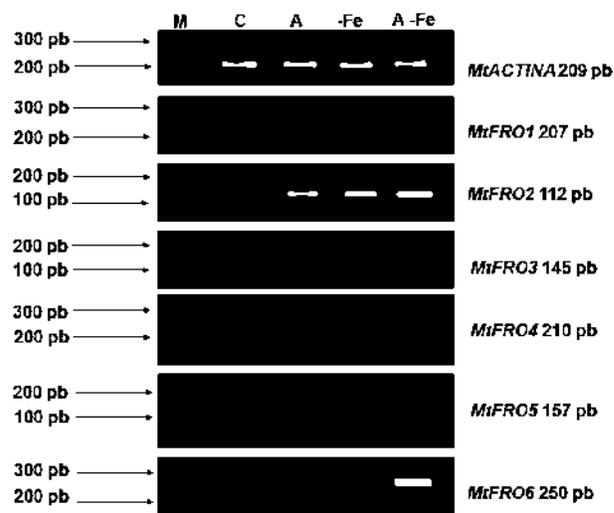
**Fig. 10. Expresión de los genes *FRO* en el tallo de *M. truncatula*.** A partir de cDNA del tallo se realizaron reacciones de PCR para evaluar la expresión de los genes *MtFRO*. Se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. Las bandas correspondientes a los genes evaluados, se observan en cada tratamiento. La letra M, representa el marcador de peso molecular, C representa la condición control, A indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y A -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

De acuerdo con los resultados de PCR, las hojas de *M. truncatula* expresan los genes *MtFRO2*, *MtFRO4* y *MtFRO5* (Fig. 11). Con base en la intensidad de las bandas y al comparar con el control, la expresión de los genes *MtFRO2* y *MtFRO4* aumenta en deficiencia de hierro y en presencia de bacteria sin importar las condiciones de hierro. Las bandas de expresión del gen *MtFRO5* se observaron únicamente en deficiencia de hierro y en deficiencia de hierro con inóculo de *A. agilis* UMCV2, lo cual indica que dichas condiciones aumentan la expresión de este gen. Los genes *MtFRO1*, *MtFRO3* y *MtFRO6* no se expresan en hoja, debido a que no se observó presencia de banda en los geles. Se utilizó el gen *MtActina* como control de carga.

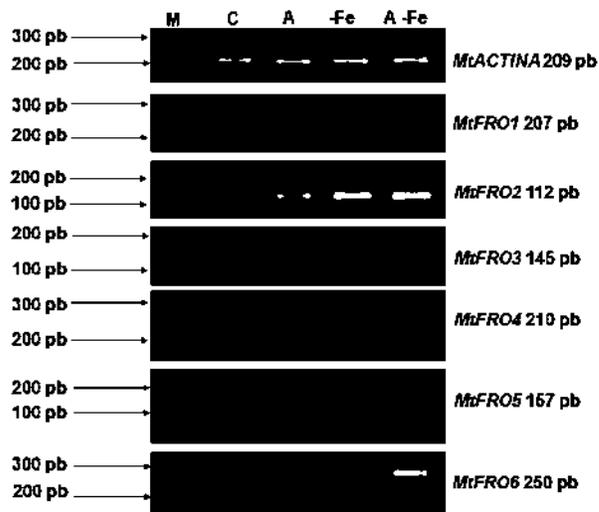


**Fig. 11. Expresión de los genes *FRO* en la hoja de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de hoja se realizaron reacciones de PCR para evaluar la expresión de los genes *MtFRO*. Se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. Las bandas correspondientes a los genes evaluados, se observan en cada tratamiento. La letra M, representa el marcador de peso molecular, C representa la condición control, A indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y A -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

Finalmente, la expresión de los genes *MtFRO* en flor y vaina de *M. truncatula* fue igual, habiendo expresión de los genes *MtFRO2* y *MtFRO6* (Fig.12 y Fig. 13). En el caso de *MtFRO2* se observó aumento de la expresión en condiciones de deficiencia de hierro y al inocular *A. agilis* UMCV2, sin importar las condiciones de hierro. Adicionalmente, el gen *MtFRO6* únicamente se expresó en deficiencia de hierro con presencia de bacteria. Los genes *MtFRO1*, *MtFRO3*, *MtFRO4* y *MtFRO5*, no se expresan en dichos órganos, lo cual se comprueba con la ausencia de banda en los geles. Se utilizó el gen *MtActina* como control de carga.



**Fig. 12. Expresión de los genes *FRO* en la flor de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de flor se realizaron reacciones de PCR para evaluar la expresión de los genes *MtFRO*. Se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. Las bandas correspondientes a los genes evaluados, se observan en cada tratamiento. La letra M, representa el marcador de peso molecular, C representa la condición control, A indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y A -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.



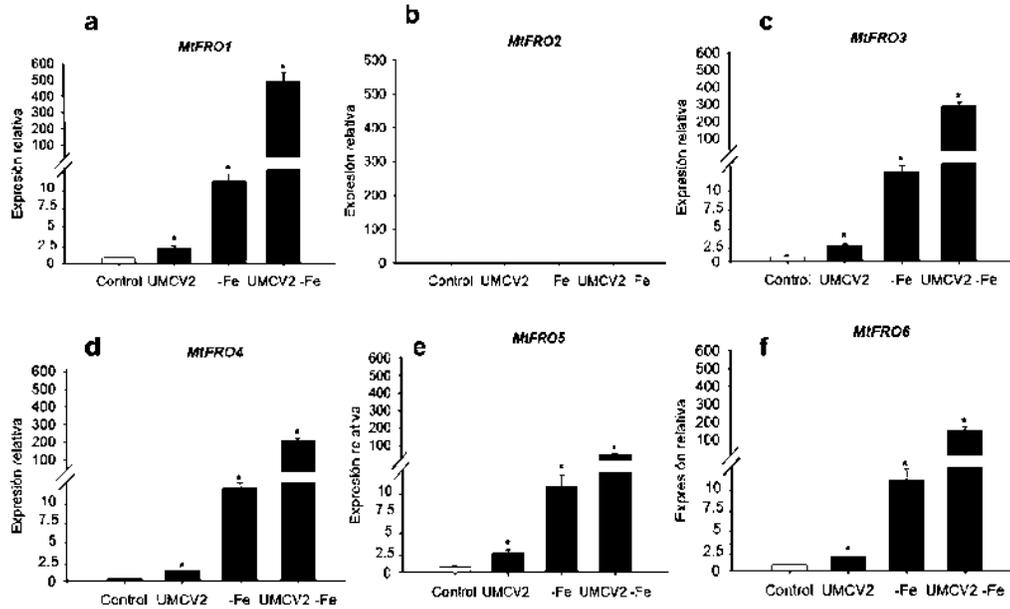
**Fig. 13. Expresión de los genes *FRO* en la vaina de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de vaina se realizaron reacciones de PCR para evaluar la expresión de los genes *MtFRO*. Se utilizó el gen endógeno *MtActina* como control de carga. Las bandas correspondientes a los genes evaluados, se observan en cada tratamiento. La letra M, representa el marcador de peso molecular, C representa la condición control, A indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y A -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

En todos los genes que se expresan en los diferentes órganos de *M. truncatula*, se observa un incremento en la intensidad de la banda en suficiencia de hierro con bacteria, siendo más marcado en deficiencia de hierro y aditivo en deficiencia con presencia de bacteria, sin embargo, al ser la técnica de PCR, semicuantitativa, se requiere analizar la expresión de los genes mediante una técnica más sensible y que sea cuantitativa.

### **7.3 Efecto de la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 en la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *Medicago truncatula***

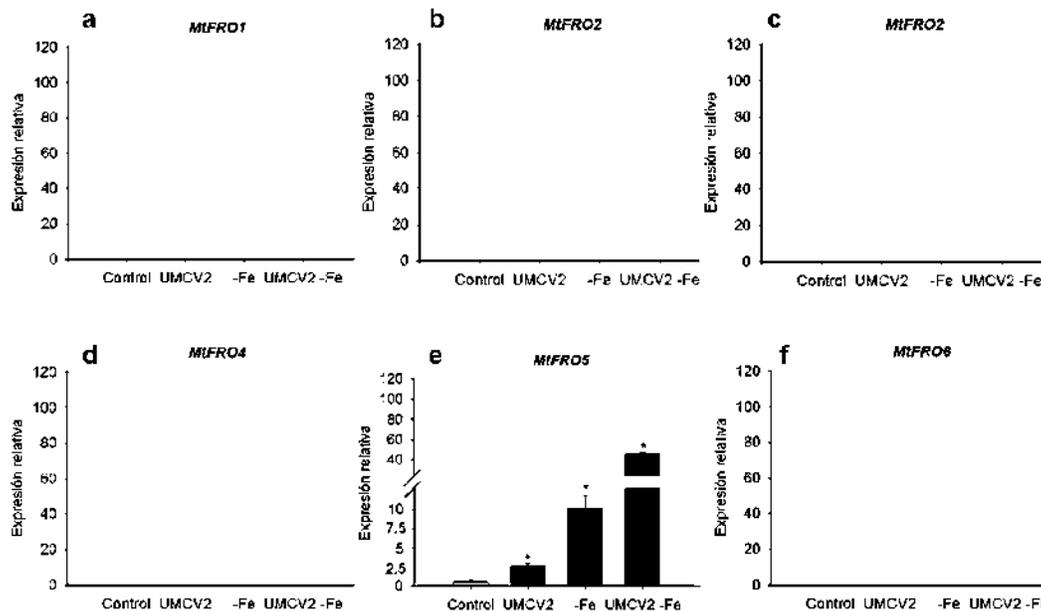
A partir del cDNA previamente sinterizado de los diferentes órganos de *M. truncatula*, se realizaron reacciones por triplicado de qPCR considerando cada tratamiento (Control, UMCV2, -Fe y UMCV2 -Fe) y se analizó la expresión de los genes *MtFRO*, utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct$ .

En la raíz, la expresión de los genes *MtFRO1*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, *MtFRO5* y *MtFRO6*, aumentó de manera significativa en cada tratamiento respecto al control. La expresión de los genes *MtFRO1* (Fig. 14a), *MtFRO3* (Fig. 14c), *MtFRO4* (Fig. 15d), *MtFRO5* (Fig. 14e) y *MtFRO6* (Fig. 14f) en condiciones de suficiencia de hierro y presencia de *A. agilis* UMCV2 se indujo 2, 2.8, 3.13, 2.5 y 1.4, veces en comparación al control respectivamente; en condiciones de deficiencia de hierro se indujo 14.7, 20, 34.9, 14.4 y 14.8, veces respectivamente con respecto al control; en condiciones de deficiencia de hierro y UMCV<sup>2</sup> se indujo 494, 291.3, 203.9, 48.3 y 152.5 veces respectivamente. El gen *MtFRO2* (Fig. 14b) no se expresa en raíz. Los resultados indican que la condición de deficiencia de hierro, induce la expresión de los genes *MtFRO* y el efecto es sinérgico al inocular *A. agilis* UMCV2, sin embargo, la presencia de la bacteria *per se*, induce la expresión de dichos genes, como lo indican los resultados de la condición hierro más *A. agilis* UMCV2.



**Fig. 14. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtFRO* en la raíz de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de la raíz se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtFRO*. a) Expresión del gen *MtFRO1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtFRO2* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. c) Expresión del gen *MtFRO3* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. d) Expresión del gen *MtFRO4* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. e) Expresión del gen *MtFRO5* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. f) Expresión del gen *MtFRO6* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

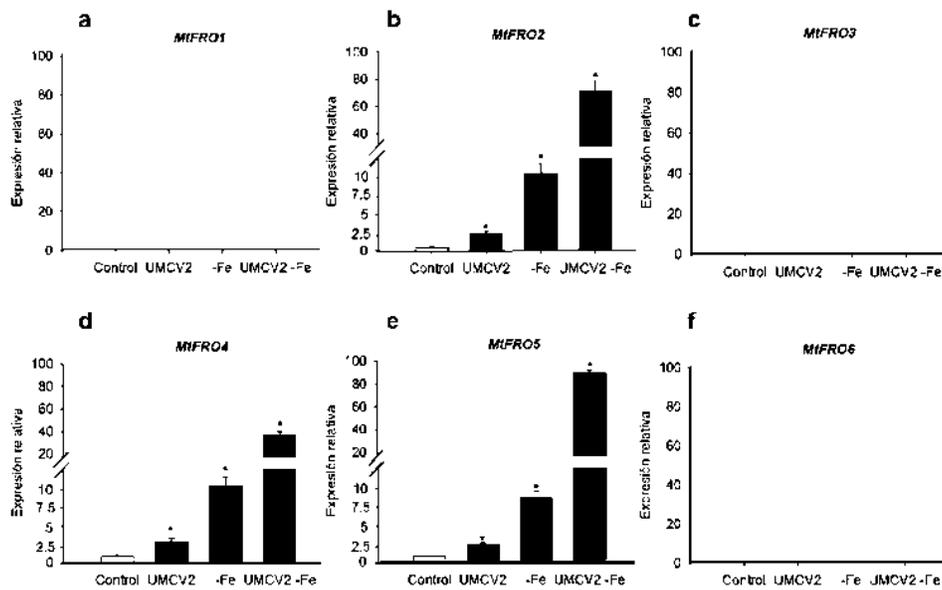
Con base en los resultados de qPCR, la expresión del gen *MtFRO5* del tallo de *M. truncatula*, aumenta 3.7 veces respecto al control, en presencia de *A. agilis* UMCV2 y hierro; 16.6 veces en deficiencia de hierro y 44.8 veces en deficiencia de hierro con *A. agilis* UMCV2 (Fig. 15f). Los genes *MtFRO1* (Fig. 15a), *MtFRO2* (Fig. 15b), *MtFRO3* (Fig. 15c), *MtFRO4* (Fig. 15d) y *MtFRO6* (Fig. 15e) no se expresan en tallo. Los resultados indican que la bacteria *A. agilis* UMCV2 induce la expresión del gen *MtFRO5* de tallo, pero el efecto es mayor en combinación con condiciones de deficiencia de hierro.



**Fig. 15. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtFRO* en el tallo de *M. truncatula*.**

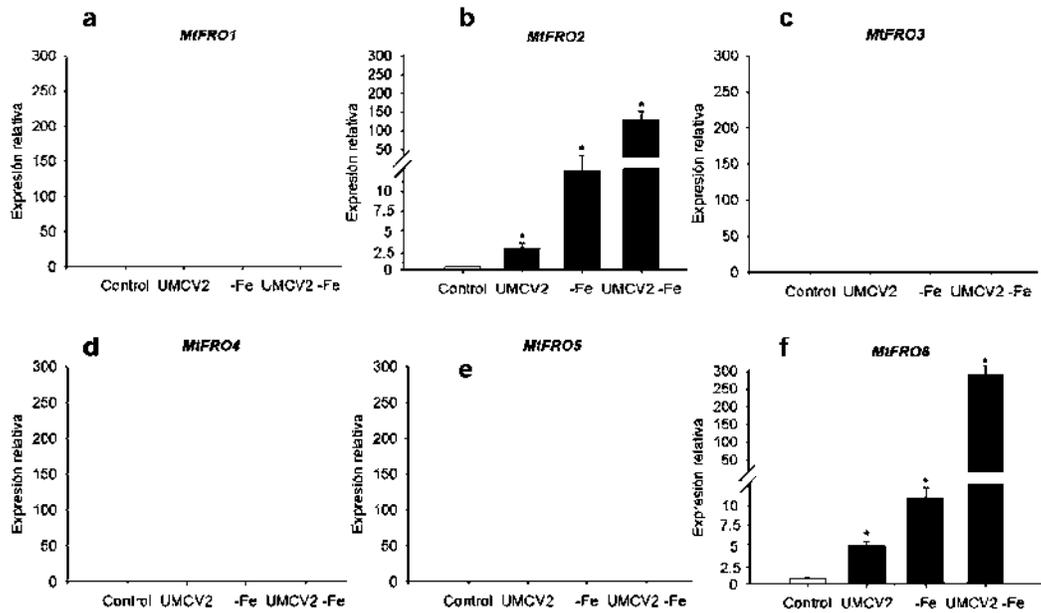
A partir de cDNA del tallo se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtFRO*. a) Expresión del gen *MtFRO1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtFRO2* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. c) Expresión del gen *MtFRO3* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. d) Expresión del gen *MtFRO4* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. e) Expresión del gen *MtFRO5* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. f) Expresión del gen *MtFRO6* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

Los resultados de expresión de los genes *MtFRO* de hoja de *M. truncatula*, muestran que *MtFRO2* (Fig. 16b), *MtFRO4* (Fig. 16d) y *MtFRO5* (Fig. 16e) aumentan su expresión 4.4, 2.5 y 2 veces respecto al control en condiciones de hierro suficiente y presencia de *A. agilis* UMCV2; 23.7, 36.5 y 9.74 veces en condiciones de deficiencia de hierro y 72.93, 36.35 y 89.1 veces en deficiencia de hierro e inoculación con *A. agilis* UMCV2. Los genes *MtFRO1* (Fig. 16a), *MtFRO3* (Fig. 16c) y *MtFRO6* (Fig. 16f), no se expresan en hoja. Los datos indican que, en la hoja, la expresión de los genes *MtFRO2*, *MtFRO4* y *MtFRO5* se induce con la presencia de *A. agilis* UMCV2 y el efecto es mayor en combinación con deficiencia de hierro

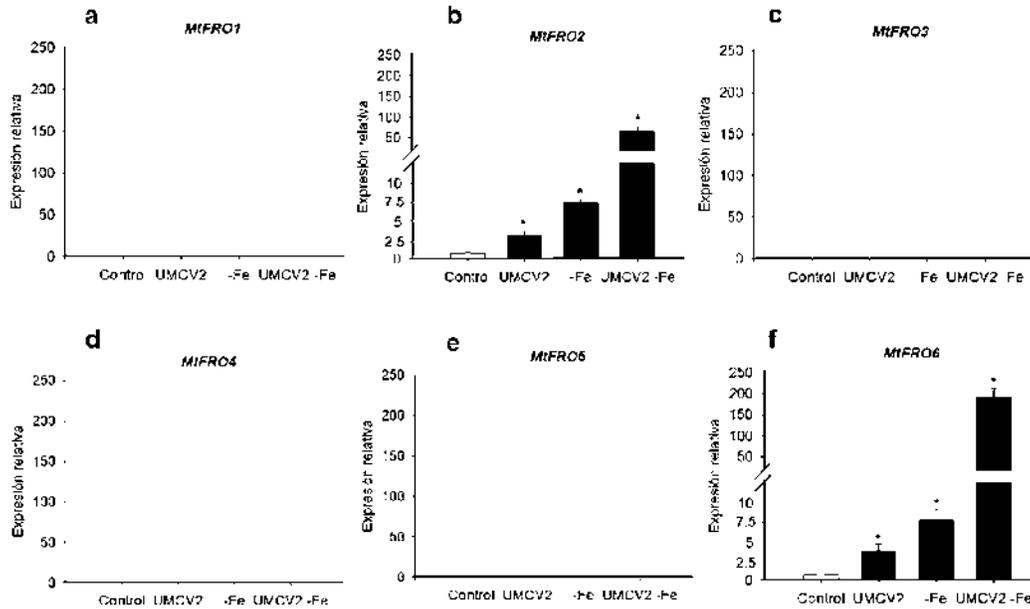


**Fig. 16. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtFRO* en la hoja de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de la hoja se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtFRO*. a) Expresión del gen *MtFRO1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtFRO2* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. c) Expresión del gen *MtFRO3* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. d) Expresión del gen *MtFRO4* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. e) Expresión del gen *MtFRO5* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. f) Expresión del gen *MtFRO6* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

La expresión de los genes *MtFRO* en la flor y la vaina de *M. truncatula* fue similar: En condiciones de hierro suficiente e inoculo de *A. agilis* UMCV2 *MtFRO2* (Fig. 17b y Fig. 18b) y *MtFRO6* (Fig. 17f y Fig. 18f) mostraron un aumento de 5.6 y 5.2 veces respecto al control en flor y un aumento de 3 y 4.1 veces en vaina; en deficiencia de hierro el aumento fue de 28.2 y 12.8 veces en flor y 8.8 y 9.3 veces en vaina; finalmente en condiciones de deficiencia de hierro y presencia de *A. agilis* UMCV2 se observó un aumento 128.4 y 298 veces en flor y 66.8 y 191.2 en vaina veces, siempre respecto al control. Los genes *MtFRO1* (Fig. 17a y Fig. 18a), *MtFRO3* (Fig. 17c y Fig. 18c), *MtFRO4* (Fig. 17d y Fig. 18d) y *MtFRO5* (Fig. 17e y Fig. 18e) no se expresan en flor ni en vaina de acuerdo. Se concluye que tanto la deficiencia de hierro con la bacteria *A. agilis* UMCV2 inducen la expresión de los genes *MtFRO2* y *MtFRO6* en flor y en vaina.



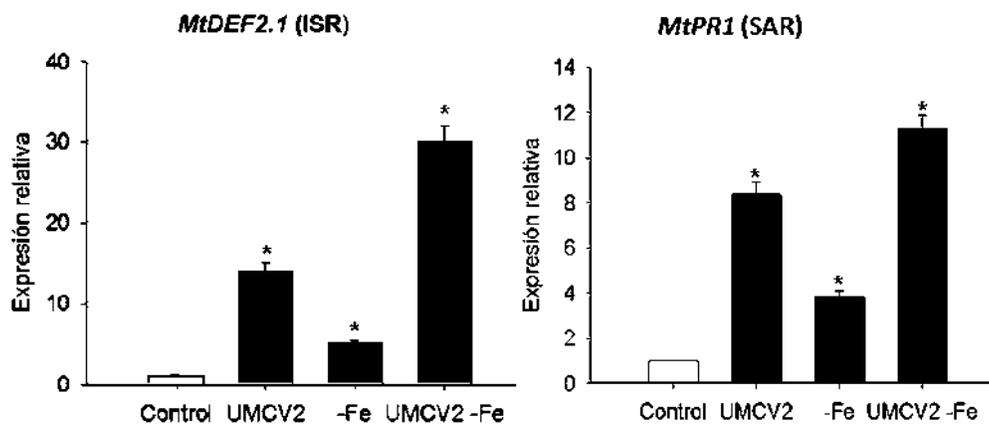
**Fig. 17. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtFRO* en la flor de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de la vaina se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtFRO*. a) Expresión del gen *MtFRO1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtFRO2* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. c) Expresión del gen *MtFRO3* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. d) Expresión del gen *MtFRO4* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. e) Expresión del gen *MtFRO5* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. f) Expresión del gen *MtFRO6* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.



**Fig. 18. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtFRO* en la vaina de *M. truncatula*.** A partir de cDNA de la vaina se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtFRO*. a) Expresión del gen *MtFRO1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtFRO2* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. c) Expresión del gen *MtFRO3* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. d) Expresión del gen *MtFRO4* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. e) Expresión del gen *MtFRO5* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. f) Expresión del gen *MtFRO6* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de qPCR con genes relacionados a la defensa: *MtDEF2.1*, un gen de respuesta a ácido jasmónico, involucrado con la Resistencia Sistémica Inducida (ISR por sus siglas en inglés) y *MtPR1*, un gen de respuesta a ácido salicílico, involucrado con la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés). Estos genes, aumentan su expresión en presencia de microorganismos endófitos (ISR, generalmente) o patógenos (SAR, generalmente) debido a que su presencia desencadena respuestas de defensa en la planta. Se observó un aumento en la expresión del gen *MtDEF2.1* de 12.9 veces respecto al control al inocular la bacteria, sin embargo, la deficiencia de hierro también indujo la expresión del gen, la cual aumento 4 veces en deficiencia de hierro, sin bacteria y 29.1 veces en deficiencia de hierro y presencia de bacteria (Fig. 19a). La expresión del gen *MtPR1*, también aumentó, pero fue menor en

comparación con *MtDEF2.1*; se observó un aumento de 12.7 veces respecto al control en presencia de la bacteria, 3.2 en deficiencia de hierro y 14.3 en deficiencia de hierro e inóculo de *A. agilis* UMCV2 (Fig. 19b). Lo anterior indica que la bacteria *A. agilis* UMCV2 desencadena los dos tipos de defensa (ISR y SAR) en *M. truncatula*, pero la inducción expresión de los genes relacionados a ISR es mayor en presencia de esta; también se observó un aumento en la expresión de los genes de defensa, relacionado a la deficiencia de hierro, lo cual está relacionado con la Tolerancia Sistémica Inducida (IST) que se desencadena junto a la ISR.



**Fig. 19. Análisis por qPCR de la expresión de los genes *MtDEF 2.1* y *MtPR1* en la planta *M. truncatula*.** A partir de cDNA de la hoja se realizaron reacciones de qPCR para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre la expresión de los genes *MtDEF 2.1* y *MtPR1*. a) Expresión del gen *MtDEF2.1* en los diferentes tratamientos. b) Expresión del gen *MtPR1* en los diferentes tratamientos en los diferentes tratamientos. El control representa la condición de hierro suficiente y sin bacteria, UMCV2 indica la condición de suficiencia de hierro con presencia de bacteria, -Fe hace referencia a la condición de deficiencia de hierro sin bacteria y UMCV2 -Fe indica deficiencia de hierro y presencia de bacteria.

## 8 DISCUSIÓN

La deficiencia de hierro, es uno de los principales problemas nutrimentales que enfrentan las plantas, debido a la escasa solubilidad del hierro en el suelo, lo cual limita la disponibilidad de este metal para las raíces de las plantas (Mimmo *et al.*, 2014). Debido a la importancia del hierro en la biosíntesis de clorofila, esencial para el proceso de fotosíntesis (Anshika y Connolly, 2013), las plantas requieren absorber hierro suficiente, para lo cual han desarrollado dos estrategias: la estrategia I basada en la reducción de hierro (Curie *et al.*, 2003) y la estrategia II basada en la quelación de hierro (Curie y Briat, 2001). Los genes *FRO*, son elementos clave en la estrategia I, debido a que se ha demostrado que estos genes realizan la reducción de  $Fe^3$  a  $Fe^2$  (Robinson *et al.*, 1999), estos genes han sido estudiados en diversas plantas estrategia I: *A. thaliana* (Robinson *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006), *P. sativum* (Waters *et al.*, 2002), *L. esculentum* (Li *et al.*, 2004), *C. junus* y *P. trifoliata* (Li *et al.*, 2002), *C. sativum* (Waters *et al.*, 2007), *A. hypogaea* (Ding *et al.*, 2009).

En la planta *M. truncatula* se han identificado 6 genes *FRO* (Andaluz *et al.*, 2009; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2012), cuya expresión se ha observado tanto en parte aérea como en raíz, no mas no de manera órgano específica. En el presente trabajo se realizó un escrutinio *in silico* de los genes *MtFRO* en el servidor web MtGEA, dicho servidor, clasificó mediante anotaciones GO, la función de los genes de interés; todos los genes evaluados presentaron actividad de férrico quelato reductasa, a excepción de *MtFRO6*, el cual estuvo involucrado en el metabolismo del oxígeno y fue clasificado como una “*Respiratory burst oxidase homolog protein B*”; sin embargo, de acuerdo con el servidor, contiene los dominios característicos de una enzima *FRO*, además de que Orozco-Mosqueda *et al.*, 2012, previamente evaluó la función de dicho gen en el proceso de deficiencia de hierro. Los resultados del escrutinio, sobre la expresión de los genes *MtFRO* indican que el gen *MtFRO1* se expresa en raíz, el gen *MtFRO2* se expresa principalmente en hoja y tiene una expresión basal en tallo, los genes *MtFRO3* y *MtFRO4* se expresan en raíz y presentan expresión basal en tallo, hoja, flor y vaina, el gen *MtFRO5* se expresa en

hoja y muestra niveles basales de expresión en tallo, flor y vaina, finalmente, el gen *MtFRO6* se expresa en todos los órganos

Una estrategia similar ya ha sido utilizada para conocer la expresión órgano específica de genes parálogos. Zhou *et al*, (2011), utilizando en el servidor web MtGEA, analizaron la expresión de 3 genes “*PIN FORMED*” (*PIN*) de *M. truncatula* involucrados en el transporte de eflujo de auxinas: *MtPIN4*, *MtPIN5* y *MtPIN10* debido a la similitud de estos con el gen *PIN1* de *A. thaliana* el cual transporta auxinas al meristemo y cuya pérdida de función ocasiona ausencia de flores y órganos laterales, además de defectos en la separación de éstos. Los análisis de expresión, indicaron que en general, la expresión de *MtPIN4* es más alta que la de *MtPIN10*. Adicionalmente, la expresión de *MtPIN5* fue muy baja, excepto en la semilla en desarrollo y la cubierta de la semilla. De acuerdo con los resultados obtenidos del servidor web MtGEA, los autores concluyen que el aumento de la expresión de *MtPIN5*, pero no de *MtPIN4* y *MtPIN10*, en la cubierta de la semilla podría implicar una función particular de este gen en dicho órgano. Guefrachi *et al.*, (2014), también utilizaron el servidor web MtGEA para evaluar la expresión de 334 genes “*Nitrogen Catabolite Repression*” (*NCR*) en 267 de las 274 condiciones presentes en el servidor y observaron que todos, excepto cinco de los 334 genes se expresaron en nódulos, pero no en otros órganos de la planta. A pesar de que se puede considerar que la predicción de la expresión de genes de *M. truncatula*, realizada con el servidor web MtGEA, es buena debido a que los datos que se obtienen provienen de experimentos realizados previamente, utilizando microarreglos; es necesario comprobar los resultados mediante PCR, lo cual no fue realizado por los autores.

Una vez que se identificó que la expresión de los genes *MtFRO* sí es órgano específica, se realizó un árbol filogenético para comparar los genes *MtFRO*, con los genes *FRO* previamente reportados. Se identificaron tres clusters: uno de genes que se expresan en raíz, otro de genes que se expresan en hoja y uno de genes cuya proteína difiere estructuralmente de los genes *FRO*; en este tercer cluster se identificó al gen *MtFRO6*, el cual se relacionó con el gen *AtRBOHA*. Adicionalmente,

los genes *FRO* de plantas monocotiledóneas se relacionan con los genes *FRO* de plantas dicotiledóneas, lo cual indica que estos genes surgieron antes de la separación de dichas plantas. Existen genes *FRO* de una misma especie que se agrupan (*AtFRO5* y *AtFRO4*, *AtFRO1* y *AtFRO3*, *AtFRO7* y *AtFRO6*; *MtFRO3* y *MtFRO4*; *MtFRO2* y *MtFRO5*), lo que sugiere que dichos genes se originaron por duplicación. Finalmente, debido a la formación de clusters para genes que se expresan en diferentes órganos, se considera que hubo un evento temprano de especialización órgano específica.

Debido a que los genes *MtFRO2* y *MtFRO5*, se relacionan con el gen *AtFRO7* que codifica para una enzima FRO, localizada en el cloroplasto (Jeong et al., 2008) se realizó una predicción de la localización subcelular de los seis genes *FRO* de *M. truncatula* en el servidor web ProtComp, utilizando su secuencia de aminoácidos. Los resultados del árbol filogenético concuerdan con los obtenidos en el ser web: únicamente el gen *MtFRO2* se localiza en cloroplasto

Posterior al escrutinio *in silico*, se realizaron reacciones de PCR con cDNA de cada uno de los órganos de interés para los 6 genes *MtFRO*, con la finalidad de tener una evidencia física de la expresión órgano específica de los genes *MtFRO*. De acuerdo con los resultados de PCR, se observa que el gen *MtFRO1* y *MtFRO3* se expresan en raíz, *MtFRO2* se expresa en hoja, flor y vaina, *MtFRO4* se expresa en raíz y hoja, *MtFRO5* se expresa en raíz, tallo y hoja y *MtFRO6* se expresa en raíz, flor y vaina. El hecho de observar expresión de diversos genes *FRO* en un sólo órgano, podría indicar que estos se localizan en las diferentes células y tejidos de este, para así, facilitar la reducción y transporte de hierro (Mukherjee et al., 2006). Adicionalmente, la intensidad de la banda de los genes *MtFRO*, aumento en condiciones de deficiencia de hierro y fue mayor en deficiencia de hierro con inóculo de *A. agilis* UMCV2 y se observó un ligero aumento en la intensidad de la banda en condiciones de suficiencia de hierro con inóculo; lo cual indica que la presencia de la bacteria induce la expresión de los genes *MtFRO*. Los resultados concuerdan con los de Andaluz et al., (2009) que aislaron el primer gen *FRO* de *M. truncatula* y también observaron un aumento en la intensidad de banda de éste en condiciones

de deficiencia de hierro. Orozco-Mosqueda et al, 2012 aisló fragmentos de 5 genes *MtFRO* adicionales mediante una búsqueda *in silico* y observó la expresión de estos en raíz y parte aérea en condiciones de suficiencia o deficiencia de hierro. Los resultados son similares a los de Andaluz *et al.*, (2009) y los del presente trabajo: se observó un aumento en la intensidad de banda en condiciones de deficiencia de hierro. En diversos experimentos, también se ha observado aumento en la expresión de los genes *FRO* en condiciones de deficiencia de hierro: *A. thaliana* (Robinson et al., 1999), *P. sativum* (Waters et al, 2002), *L. esculentum* (Li et al., 2004), *C. junus* y *P. trifoliata* (Li et al., 2002), *C. sativum* (Waters et al., 2007), *A. hypogaea* (Ding et al., 2009). Lo anterior, indica que los genes *FRO* reportados hasta el momento, son funcionales y responden a la deficiencia de hierro.

En *M. truncatula* no existen trabajos previos a este, relacionados a la expresión órgano específica de los genes *FRO*, sin embargo, Wu *et al.*, (2005) y Mukherjee *et al.*, (2006), elaboraron perfiles de expresión de los genes *FRO* en distintos órganos de *A. thaliana*, obteniendo resultados distintos. Wu et al., 2005 realizó reacciones de PCR y observó que *AtFRO1* se expresa basalmente en raíz, *AtFRO2* se expresa en raíces y flores, *AtFRO3* en raíces, flores y cotiledones, *AtFRO4* se expresa en cotiledón, *AtFRO5* se expresa en flor, *AtFRO6* se expresa en flor, *AtFRO7* se expresa en flor, cotiledón y tricomas y *AtFRO8* se expresa en flor y venas de las hojas. Por otra parte, Mukherjee *et al.*, 2006 mediante qPCR, observaron expresión de *AtFRO1* en silicua, *AtFRO2* en raíz, tallo, roseta, silicua y flor, *AtFRO3* en raíz, tallo, roseta, silicua y flor, *AtFRO4* expresión basal en silicua, *AtFRO5* Expresión basal en roseta y flor, además de expresarse en raíz, *AtFRO6* expresión en Roseta y tallo y expresión alta en silicua, *AtFRO7* expresión en Roseta y silicua y expresión alta en silicua y expresión *de AtFRO8* en tallo, roseta y flor, además de expresión basal en silicua. Tanto Wu *et al.*, (2005 como Mukherjee *et al.*, 2006, percibieron aumento de la expresión de los genes *FRO* en deficiencia de hierro, al igual que se observó en el presente trabajo.

La técnica de qPCR es un método esencial para las investigaciones de expresión genética y análisis de vías biológicas por varias razones: la técnica es

rápida, altamente sensitiva y altamente reproducible (Vandesompele *et al.*, 2002). Adicional a los experimentos de PCR para probar el efecto de *A. agilis* sobre la expresión de los genes *MtFRO*, se realizaron reacciones de qPCR con cDNA de cada uno de los órganos de interés y se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para analizar la inducción de la expresión de los genes.

Se observó que, en todos los órganos evaluados, la expresión de los genes *MtFRO* aumentó en presencia de la bacteria, sin embargo, la deficiencia de hierro junto con *A. agilis* UMCV2 tuvieron efecto sinérgico, mostrando dicha combinación la inducción en la expresión más alta en dichos genes. En la raíz, se obtuvieron los valores de inducción más altos que fueron desde 152.2 a 493 veces respecto al control, cuando las plantas deficientes de hierro fueron inoculadas con la bacteria. Sobreexpresiones tan altas en genes *FRO* no son inusuales Connolly *et al.*, (2003), cuantificó por qPCR que en condiciones de deficiencia de Fe el gene *FRO2* de *A. thaliana*: se indujo 2720 respecto al control. Por su parte, Ye *et al.*, (2015), observaron que el gen *AtFRO2* se indujo 147 veces y el gen *AtIRT1* i 999 veces en condiciones de deficiencia de hierro respecto al control., lo cual concuerda con nuestros resultados. Paralelamente, Mukherjee *et al.*, (2006) obtuvieron valores de inducción en la expresión de *AtFRO2* de 500 veces en deficiencia de hierro comparado con el control.

En nuestro grupo de trabajo se tienen diversos antecedentes sobre *A. agilis* UMCV2, la cual se ha observado que, mediante compuestos orgánicos volátiles, promueve el crecimiento vegetal (PGPR) en *Medicago sativa* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011), *M. truncatula* (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013) y en *Sorghum bicolor* (Castulo-Rubio *et al.*, 2015); el efecto se atribuye principalmente al aminolípido dimetilhexadecilamina. En un trabajo reciente, Montejano-Ramírez, (2014), observó un aumento en la expresión de los genes *MtFRO* de raíz o parte aérea, en presencia de los compuestos volátiles orgánicos de *A. agilis* UMCV2 o en presencia del compuesto puro dimetilhexadecilamina, siendo el efecto mayor en combinación con deficiencia de hierro. Un efecto similar se observó en la expresión del gen *SbFRO1*

*bicolor* (Cástulo-Rubio *et al.*, 2015), el cual se tuvo mayor inducción en deficiencia de hierro y presencia de los volátiles de *A. agilis* UMCV2 o dimetilhexadecilamina.

En el presente trabajo se utilizó un sistema *in vivo*, por tanto, los resultados de aumento en la expresión de los genes *MtFRO*, obtenidos en el presente trabajo no pueden explicarse por una acumulación de compuestos orgánicos volátiles en un espacio confinado como el empleado por Velázquez-Becerra *et al.* (2011), Orozco-Mosqueda *et al.* (2013) y Cástulo-Rubio *et al.*, (2015) y se requiere otra explicación. Una posibilidad que se exploró fue la inducción de los genes de defensa: *MtDEF 2.1* y *MtPR1*.

Se sabe que las bacterias PGPR inducen la defensa ISR (Van Loon *et al.*, 1998) y por tanto la expresión de genes relacionados a esta: *PDF1.2* y *Hel*, paralelamente se conoce que, actinobacterias endófitas aisladas del trigo, inducen la expresión tanto de genes relacionados a SAR (*PR1* y *PR4*) como a ISR (*PDF1.2* y *Hel*), lo cual concuerda con los resultados de este trabajo. Interesantemente, las PGPRs también inducen un fenómeno nombrado “Tolerancia Sistémica Inducida” (IST) el cual desencadena resistencia a sequía, salinidad y altas o bajas temperaturas (Yang *et al.*, 2009). Las ISR, SAR e IST son respuestas relacionadas. En un modelo propuesto por Mohamed *et al.*, (2013), se considera que los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias PGPRs, desencadenan la respuesta SAR e ISR, por medio del aumento en la síntesis de etileno y ácido salicílico, lo cual induce la expresión de los genes *PR* y *DEF*, por lo tanto, establece dichas respuestas. Por otro lado, los compuestos orgánicos volátiles inducen la expresión de factor de transcripción *FIT1* en toda la planta, induciendo la expresión de los genes *FRO2* e *IRT1* y mejorando la respuesta a deficiencia de hierro, desencadenando así, la IST. En nuestros resultados, se observó la relación de las respuestas, antes mencionada, debido a un aumento en la expresión de los genes *MtDEF 2.1* y *MtPR1* en deficiencia de hierro y un efecto sinérgico en deficiencia de hierro e inóculo de *A. agilis* UMCV2 y un comportamiento similar de los genes *MtFRO*. Kobayashi *et al.*, (2016) proponen otro modelo en plantas estrategia II, para relacionar la ISR con la toma de hierro (IST) debido a que observaron que en

deficiencia de hierro se incrementa la expresión de los genes inducibles por jasmonato, además de que el factor de transcripción *IDEF1* que induce la expresión de genes de respuesta a hierro, también aumentó la expresión de los genes de respuesta a jasmonato y este a su vez, aumentó la expresión de dicho factor, mostrando que la vía de señalización de respuesta a deficiencia de hierro y la vía de señalización del jasmonato están conectadas. Debido a que, en nuestros resultados, en condiciones de deficiencia de hierro, se presenta una inducción en la expresión del gen *DEF2.1*, el cual responde a jasmonato, se puede considerar que ocurre un fenómeno de regulación tanto a nivel de defensa como en la toma de hierro, en la planta estrategia I *M. truncatula*, similar al que sucede en la planta estrategia II *Oryza sativa*. Adicionalmente, Kieu *et al.*, 2012, observaron un aumento en la expresión de los genes *PR* de *A. thaliana* en condiciones de deficiencia de hierro. Posteriormente Koen *et al.*, (2014), demostraron que la deficiencia de hierro plantas de *A. thaliana*, induce la expresión de los genes *PR1* y *DEF1.2* y que dicha inducción se presentó aún en estadios transitorios de deficiencia de dicho metal, siendo mayor que en presencia de ácido  $\beta$  aminobutírico, inductor de la resistencia en plantas tanto a estrés biótico como abiótico. El aumento en la expresión de los genes de defensa, fue aditivo en presencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y en condiciones de deficiencia de hierro. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, demuestran que la inducción de la expresión de ambos genes de defensa, también se induce en deficiencia de hierro y que, el efecto es mayor en presencia de la bacteria PGPR *A. agilis* UMCV2. Recientemente, Raya-González *et al.*, 2016, observaron en plantas de *A. thaliana*, que el VOC dimetilhexadecilamina producido por la PGPR *A. agilis* UMCV2 induce la expresión del gen de síntesis de jasmonato, *LOX2* y que en plantas mutantes en la conjugación (*jar1*), percepción (*coi1-1*) y en la expresión de genes de respuesta a esta fitohormona (*myc2*), no se presenta el fenotipo característico de las plantas sometidas a dimetilhexadecilamina. Considerando que, en el presente trabajo, las plantas de *M. truncatula* se inocularon con *A. agilis* UMCV2, se considera que ocurrió un fenómeno similar al anteriormente descrito, lo cual conllevó a la inducción en la expresión del gen *DEF2.1*.



## 9. CONCLUSIÓN

*A. agilis* aumenta la expresión órgano específica de los genes *FRO* de *M. truncatula*, tanto en condiciones de suficiencia como deficiencia de hierro, a la vez que induce la expresión de los genes *MtPR1* y *MtDEF2.1*, marcadores de las vías de resistencia sistémica de la planta.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Abadía J., Vázquez S., Rellán-Álvarez R., El-Jendoubi H., Abadía A., Álvarez-Fernández A., López-Millán AF. (2011) Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:471-482.

Aitken Y. (1955) Flower initiation in pasture legumes. III. Flower initiation in *Medicago tribuloides* Desr. & other annual medics. *Australian Journal of Agricultural Research* 6:258-264.

Alejandro-Ramírez N. (2013). Modificación del desarrollo temprano de la planta estratega II *Sorghum bicolor* por *Arthrobacter agilis* UMCV2. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 80pp.

Andaluz S., Rodríguez-Chelma J., Abadía A., Abadía J., López-Milán A.F. (2009) Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1082-1088.

Anshika J., Connolly E. (2013) Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*. 4:348-354.

Avilés-García M.E., Flores-Cortez I., Hernandez-Soberano C., Santoyo G., Valencia-Cantero E. (2016) La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Revista Argentina de Microbiología*. En prensa

Badri D.V., Weir T.L., van der Lelie D., Vivanco J.M. (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 642-650.

Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., van Loon LC. (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.

Barriuso J., Ramos Solano B., Gutiérrez Manero F.J. (2008) Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 98:666-672.

Bashan, Y. (1986) Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *Journal of General Microbiology* 132:3407-3414.

Bashir K., Ishimaru Y., Shimo H., Nagasaka S., Fujimoto M., Takanashi H., Tsutsumi N., An G., Nakanishi H., Nishizawa N. (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature Communications* 2: 1–7.

Bauer P., Ling H.Q., Guerinot M.L. (2007) FIT, the FER-like iron deficiency induced transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 260-261.

Bell C., Dixon R., Farmer R., Flores R., Inman J., Gonzales R., Harrison M., Paiva N., Scott A., Weller J. (2000). The *Medicago* genome initiative: a model legume database. Vol.29, No. 1

Bienfait H.F., van den Briel W., Mesland-Mul N.T. (1985) Free space iron pools in roots: generation and mobilization. *Plant Physiology* 78:596-600.

Briat J.F., Duc C., Ravet K., Gaymard F. (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800:806–814.

Busi M.V., Maliandi M.V., Valdez H., Clemente M., Zabaleta E.J., Araya A. (2006) Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant Journal* 48:873-882.

Carmel N., Tel-Ora E., Chen Y., Pick U. (2014) Iron uptake mechanism in the chrysophyte microalga *Dinobryon*. *Journal of Plant Physiology* 171:993-999.

Castulo-Rubio D. Y., Alejandre-Ramírez N., Orozco-Mosqueda M del C., Santoyo G., Macias-Rodríguez L. I., Valencia-cantero E. (2014) Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 34:611-623.

Cesco S., Neumann G., Tomasi N., Pinton R., Weiskopf L. (2010) Release of plantborne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil* 329: 1-25.

Chandel G., Banerjee S., Vasconcelos M., Grusak M.A. (2010). Characterization of the root transcriptome for iron and zinc homeostasis-related genes in indica rice (*Oryza sativa* L). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 19: 145-152.

Chen S., Sanchez-Fernandez R., Lyver E.R., Dancis A., Rea P.A. (2007) Functional characterization of AtATM1, AtATM2 and AtATM3, a subfamily of *Arabidopsis* half-molecule ABC transporters implicated in iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 21561–21571.

Chen W.W., Yang J.L., Qin C., Jin C.W., Mo J.H., Ye T., Zheng S.J. (2010) Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154: 810–819.

Cheng L., Wang F., Shou H., Huang F., Zheng L., He F., Li J., Zhao F., Ueno D., Ma JF., Wu P. (2007) Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiology* 145:1647-1657.

Cheong Y.H., Chang H.S., Xun Wang R.G, Zhu T., Luan S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wound wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129:661-677.

Colangelo E.P., Guerinot M.L. (2004) The essential bHLH protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell* 16: 3400–3412.

Connolly E.L., Campbell NH., Grotz N., Prichard CL., Guerinot ML. (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* 133:1102–1110.

Conte S.S, Walker EL. (2011) Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant* 4: 464–476.

Curie C., Briat J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 183–206.

Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F., Walker E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409: 346–349.

De Nobili M., Contin M., Mondini C., Brookes P. (2001) Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry*. 33:1163-1170.

DiDonato R.J., Roberts L.A., Sanderson T., Easley R.B., Walker E.L. (2004) *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metalcomplexes. *The Plant Journal* 39:403-414.

Ding H., Duan L., Wu H., Yang R., et al. (2009) Regulation of *AhFRO1*, an Fe(III)-chelate reductase of peanut, during iron deficiency stress and intercropping with maize. *Physiologia Plantarum* 136: 274-283.

Divol F., Couch D., Conejero G., Roschztardt H., Mari S., Curie C. (2013) The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *The Plant Cell* 25: 1040-1055

Durrett T.P., Gassmann W., Rogers E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology* 144:197-205.

Duy D., Wanner G., Meda A.R., von Wirén N., Soll J., Philipp K. (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *The Plant Cell* 19:986–1006.

Eckhardt U., Buckhout T. (1998) Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to strategy I higher plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 1219-1226.

Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of National Academy of Sciences* 93: 5624–5628.

Fourcroy P., Sisó-Terraza P., Sudre D., Savirón M., Reyt G., Gaymard F., Abadía A., Abadía J., Álvarez Fernández A., Briat JF. (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* 201:155–167.

Gallardo K., Lesignor C., Darmency M., Burstin J., Thompson R., Rochat C., Bountine Jean-pierre., Küster H., Buitinik J., Leprince L.A., Grusak M. (2006) Seed Biology of *Medicago truncatula*: *The Medicago truncatula* handbook.

Garriz A., Chamizo JA. (2001) Tú y la Química, Pearson Educación. México 808 pp.

Giehl R.F.H., Meda A.R., von Wirén N. (2009) Moving up, down, and everywhere: signaling of micronutrients in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 320-327.

Graziano M., Lamattina L. (2005) Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in Plant Science* 10:4–8.

Green L.S., Rogers E.E. (2004) FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136:2523-2531.

Guefrachi I., Nagymihaly M., Pislariu C., Van de Velde W., Ratet P., Mars M., Udvardi M. K., Kodorosi E., Mergaert P., Alunni B. (2014) Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15:712-727.

Guerinot M.L., Yi Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* 104: 815–820.

Han H.S., Lee K.D. (2005) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1:210-215.

Hanks J., Snyder A., Graham M., Shah R., Blaylock L. Harrison M., Shah D. (2005) Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Molecular Biology* 58:385-399.

Haydon M.J., Cobbett C.S. (2007) A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 1705–1719.

Haydon M.J., Kawachi M., Wirtz M., Hillmer S., Hell R., Kramer U. (2012) Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 724-37.

Heazlewood J.L., Tonti-Filippini JS., Gout AM., Day DA., Whelan J., Millar AH. (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *The Plant Cell* 16: 241–256.

Hell R., Stephan U. W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541–551.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248, 43-59.

Holden M.J., Luster D.G., Chaney R.L., Buckhout T.J., Robinson C. (1991) Fe<sup>3+</sup>-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Plant Physiology* 97: 537-544.

Ichikawa Y., Bayeva M., Ghanefar M., Potini V., Sun L., Mutharasan RK. (2012) Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export. *Proceedings of National Academy of Science* 109: 4152-4157

Ishimaru N., Kakei Y., Sato Y., Uozumi N., Yoshimura N., Nakanishi H., Nishizawa N. (2010) A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *Journal of Biological Chemistry* 286:24649–24655.

Ishimaru Y., Kakei Y., Shimo H., Bashir H., Sato Y., Sato Y., Uozumi N., Nakanishi H., Nishizawa N. K. (2011) A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *Journal of Biological Chemistry* 286:24649-24655.

Ishimaru Y., Suzuki M., Tsukamoto T., Suzuki K., Nakazono M., Koabayashi T., Wada Y., Matanabe S., Matsuhashi S., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa NK. (2006) Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *Plant Journal* 45:335-346.

Ito H y Gray W.M. (2006) A gain-of-function mutation in the Arabidopsis pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiology* 142: 63-74.

Jeong J., Cohu C., Kerkeb L., Pilon M., Connolly E.L., Guerinot M.L. (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions..*Proceedings of National Academy of Sciences* 105: 10619–10624.

Jin C.W., Li G.X., Yu X.H., Zheng S.J. (2010) Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microorganisms in the rhizosphere. *Annals of Botany* 105: 835-841.

Jin C.W., Du S.T., Chen W.W., Li G.X., Zhang Y.S., Zheng S.J. (2009) Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency induced responses under iron-limited conditions in tomato. *Plant Physiology* 150:272-280.

Karlin K.D. (1993) Metalloenzymes, structural motifs and inorganic models. *Science* 261: 701–708.

Katoh H., Hagino N., Grossman A.R., Ogawa T. (2001) Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*.183: 2779 2784.

Kieu N. P., Aznar A., Segond D., Rigault M., Simond-Cote E., Kunz C., Soulie M., Expert D. (2012) Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. 3:816-827.

Kim S.A., Punshon T., Lanzirotti A., Li L., Alonso J.M., Ecker J.R., et al. (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*314: 1295–1298.

Kobayashi T., Itai R. N., Senoura T., Oikawa T., Ishimaru Y., Ueda M., Nakanishi H., Nishizawa N. K. (2016) Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Molecular Biology* 4:533-547.

Kobayashi T., Itai R.N., Aung M.S., Senoura T., Nakanishi H., Nishizawa N.K. (2012) The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status. *Plant Journal* 69: 81–91.

Kobayashi T., Itai R.N., Ogo Y., Kakei Y., Nakanishi H., Takahashi M., Nishizawa N.K. (2009) The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. *Plant Journal* 60: 948–961.

Kobayashi T., Nagasaka S., Senoura T., Itai R.N., Nakanishi H., Nishizawa N.K. (2013) Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nature Communications* 4: 2792- 2804.

Kobayashi T., Nakayama Y., Itai R.N., Nakanishi H., Yoshihara T., Mori S., Nishizawa N.K. (2003) Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterologous tobacco plants. *Plant Journal* 36: 780–793.

Kobayashi T., Nishizawa N. (2015) Intracellular iron sensing by the direct binding of iron to regulators. *Frontiers in Plant Science* 8: 409-417.

Kobayashi T., Nishizawa N. K. (2014) Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Science* 224: 36–43.

Kobayashi T., Ogo Y., Itai R.N., Nakanishi H., Takahashi M., Mori S., Nishizawa N.K. (2007) The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron

deficiency in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences* 104: 19150–19155.

Kranzler C., Lis H., Finkel O.M., Schmetterer G., Shaked Y., Keren N. (2014) Coordinated transporter activity shape shigh-affinity iron acquisition in cyanobacteria. *The ISME Journal* 8: 409–417.

Koen E., Trapet P., Brulé D., Kulik A., Klinguer A., Atauri-Miranda L., Meunier-Priest R., Boni G., Glauser G., Mauch-Mani B., Wendehenne D., Besson-Bard A. (2014)  $\beta$ -Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in *Arabidopsis thaliana*: Link with Iron Homeostasis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:1226-1240

Larbi A., Morales F., Abadía A., Abadía J. (2010) Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply. *Journal of Plant Physiology* 167:255–260.

Lecoeur J. (2005) Developpement de la plante. In Agrophysiologie du pois protéagineux, Munier-Jolain N., Biarnès, V., Chaillet, I, Lecoeur J. and Jeuffroy M.H. (eds), Proléa UNIP-Agro Montpellier-Arvalis Institut du végétal-INRA Editions, Paris, France, 27-36.

Lesins K.A., Lesins I. (2012). Genus *Medicago* (Leguminosae): a taxogenetic study. Springer Science and Business Media.

Li L., Cheng X., Ling H.Q. (2004) Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene *LeFRO1* in tomato. *Plant Molecular Biology* 54: 125-136.

Li L., Fan Y-H., Xiao-Ying L., Yan p., Ze-Yanf Z. (2002) Expression of ferric chelate reductase gene in *Citrus junus* and *Poncirus trifoliata* tissues. *Acta Botanica Sinica* 44: 771-774.

Lindsay, W.L., Schwab, A.P. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition* 5:821-840.

Ling H.Q., Bauer P., Bereczky Z., Keller B., Ganai M. (2002) The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of National Academy of Sciences* 99: 13938–13943.

Long T.A., Tsukagoshi H., Busch W., Lahner B., Salt DE., Benfey PN. (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 22:2219-2236.

Lucena C., Waters B.M., Romera F.J., Garcia M.J., Morales M., Alcantara E., Perez-Vicente R. (2006) Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H<sup>+</sup>-ATPase gene expression by affecting *FER* (or *FER-like*) gene activity. *Journal of Experimental Botany* 57: 4145–4154.

Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants, segunda edición. Academic press, London.

Marschner, P., Crowley, D., Rengel, Z. (2011) Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root Axis-model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry* 43:883-894.

Meir S., Philosoph-Hadas S., Epstein E., Aharoni N. (1985) Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs: I. Interaction with auxin and the relation to auxin metabolism. *Plant Physiology* 78: 131-138.

Meiser J., Lingam S., Bauer P. (2011) Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide. *Plant Physiology* 157: 2154-2166.

Mikami Y., Saito A., Miwa E., Higuchi K. (2011) Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology* 49: 513-519.

Mimmo T., Del Buono D., Terzano R., Tomasi N., Vigani G., Crecchio R., Pinton R., Zocchi G., Cesco S. (2014) Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: their role in iron availability. *European Journal of Soil Science* 65: 629–642.

Mohamed A.F., Huiming Z., Choong-Min R. (2103) Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 39 1007–1018.

Montejano-Ramírez V. (2014) Modulación de la expresión de los genes *FRO* de *Medicago truncatula* por *Arthrobacter agilis* UMCV2 a través de la emisión del compuesto dimetilhexadecilamina. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 80 pp.

Moreau D., Salon Ch., Munier-Jolain N. (2006) Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant Cell and Environment* 29:1087–1098.

Morrissey J., Baxter I.R., Lee J., Li L., Lahner B., Grotz N., Kaplan J., Salt DE., Guerinot ML. (2009) The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:3326-3338.

Mukherjee I., Campbell NH., Ash JS., Connolly EL. (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (*FRO*) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223: 1178–1190.

Murad, E.; Fischer, W. R. (1988) The geobiochemical cycle of iron in iron in soils and clay minerals. Reidel Publishing Company: 1-18 pp.

Mustroph A., Zanetti ME., Jang CH., Holtan HE., Repetti PP., Galbraith DW., Girke T, Bailey-Serres J. (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:18843-18848.

Nouet C., Motte P., Hanikenne M. (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends in Plant Science* 16:395-404.

Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Sato Y., Uozumi N., Nakanishi H., Nishizawa NK. (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry* 286: 5446-5454.

Ogo Y., Itai R.N., Kobayashi T., Aung M.S., Nakanishi H., Nishizawa N.K. (2011) *OsIRO2* is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. *Plant Molecular Biology* 75: 593-605.

Ogo Y., Itai R.N., Inoue H., Suzuki M., Takahashi M., Mori S., Nishizawa NK. (2006) Isolation and characterization of *IRO2*, a novel iron regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *Journal of Experimental Botany* 57:2867–2878.

Orozco-Mosqueda Ma. del C., Santoyo G, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E. (2012) Identification and expression analysis of multiple *FRO* gene copies in *Medicago truncatula*. *Genetics and Molecular Research* 11:4402-4410.

Orozco-Mosqueda Ma del C., Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L., Santoyo G., Flores-Corez I., Alfaro-Cuevas R., Valencia-Cantero E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant and Soil* 362:51-66.

Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. (2013) The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. En: *1 World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture* 1009: 241-250.

Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Levine A. (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signaling and Behavior* 7:4009-415.

Qi Y., Wang S., Shen C., Zhang S., Chen Y., Xu Y., Liu Y., Wu Y., Jiang D. (2011) OsARF12, a transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* 193: 109–120.

Raya-González J., Velázquez-Becerra C., Barrera-Ortíz S., López-Bucio J., Valencia-Cantero E. (2016) N,N-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 253:1-12.

Rengasamy P. (2006) World salinization with emphasis on Australia. *The Journal of Experimental Botany* 57:1017-1023.

Robinson D., Hodge A., Griffiths B.S., y Fitter A.H. (1999) Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proceeding of Royal Society of London series B of Biological science* 266: 431-435.

Rodríguez-Celma J., Lin W., Fu G., Abadía J., López-Millán A., Schmidt W. (2013) Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 162:1473-1485.

Rogers E.E., Guerinot M.L. (2002). FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 1787-1799.

Romera F.J., Alcantara E. (2004) Ethylene involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by Strategy I plants. *Functional Plant Biology* 31:315–328.

Romera F.J., Garcia M.J., Alcantara E., Perez-Vicente R. (2011) Latest findings about the interplay of auxin, ethylene and nitric oxide in the regulation of Fe deficiency responses by Strategy I plants. *Plant Signal Behavior* 6:167–170.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W., Kloepper J.W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4927-4932.

Saha R., Saha N., Donofrio R.S., Bestervelt L.L. (2013) Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53:303-317.

Santi S., Schmidt W. (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* 183: 1072–1084.

Sarma B.K., Yadav S.K., Singh D.P., Singh H.B. (2012). Rhizobacteria mediated induced systemic tolerance in plants: prospects for abiotic stress management. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 225-238).

Schaaf G., Ludewig U., Erenoglu B., Mori V., Kitahara T., von Wirén N. (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore and nicotianamine- chelated metals. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9091-9096.

Schikora A., Schmidt W. (2001) Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiology* 125: 1679–1687.

Schmidt W, Tittel J, Schikora A. (2000). Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 122:1109–1118.

Schmidt W. (1999) Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 141: 1–26.

Selote D., Samira D., Matthiadis D., Gillikin J.W., Long TA. (2015) Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors 1. *Plant Physiology* 167: 273–286.

Shu C., Sung MW., Stewart M.D., Igumenova TI., Tan X., Li P. (2012) The structural basis of iron sensing by the human F-box protein FBXL5. *European Journal of Chemical Biology, Synthetic Biology and Bio-nanotechnology* 13: 788–791.

Sivitz A., Grinvalds C., Barberon M., Curie C., Vert G (2011) Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses. *The Plant Journal* 66:1044–1052.

Solti, Á., Kovács K., Basa B., Vértés A., Sárvári É., Fodor F. (2012) Uptake and incorporation of iron in sugar beet chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 91–97.

Sonier M., Weger H. (2010) Plasma membrane ferric reductase activity of iron-limited algal cells is inhibited by ferric chelators. *Biometals* 23: 1029-1042.

Stacey M.G., Patel A., McClain WE., Mathieu M., Remley M., Rogers EE., Gassmann W., Blevins DG., Stacey G. (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology* 146:589–601.

Tomasi N., Weisskopf L., Renella G., Landi L., Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., Torrent V., Martinoia E., Cesco S. (2008) Flavonoids of white lupin roots participate in phosphorus mobilization from soil. *Soil Biological Biochemistry* 40: 1971-1974.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:1-11.

Van Loon L.C, Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *The Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.

Vazzola V., Losa A., Soave C., Murgia I. (2007) Knockout of frataxin gene causes embryolethality in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581: 667–672.

Vert G., Grotz N., Dedaldechamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F., Curie C. (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. *The Plant Cell* 14:1223–1233.

Vigani G., Zocchi G. (2009) The fate and the role of mitochondria in Fe-deficiente roots of strategy I plants. *Plan Signal Behavior* 4:375-379.

Vigani G., Zocchi G., Bashir K., Philippar K., Briat J.F. (2013) Signal from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends in Plant Science* 18:305-311.

Waters B.M., Blevins D.G., Eide D.J. (2002). Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology* 129: 85-94.

Waters B.M., Lucena C., Romera F.J. (2007) Ethylene involvement in the regulation of the H<sup>+</sup>-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 293–301.

Wu H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X., Ling H.Q. (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Physiology* 46: 1505-1514.

Wu J., Wang C., Zheng L., Wang L., Chen Y., Whelan J., Shou H. (2011) Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 62:667–674.

Wu A.C., Lesperance L., Bernstein H. (2002) Screening for iron deficiency. *Pediatrics Review* 23: 171–178.

Yadavalli V., Jolley C.C., Malleda C., Thangaraj B., Fromme P., Subramayam R. (2012) Alteration of proteins and pigments influence the function of photosystem I under iron deficiency from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* 7:384-395.

Yang Y., Ou B., Zhang J., Si W., Gu H., Qin G., Qu L. J. (2014). The *Arabidopsis* mediator subunit MED16 regulates iron homeostasis by associating with EIN3/EIL1 through subunit MED25. *The Plant Journal*. 77: 838-851.

Yang J, Kloepper J.W., Ryu C.M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14:1-4.

Ye L., Li L., Wang L., Wang S., Li S., Du J., Zhang S., Shou H. (2015) MPK3/MPK6 are involved in iron deficiency-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 6:1-10.

Yong X., Quan Y., Kai S., Wei C., Jian S. (2016) Increased sucrose accumulation regulates iron-deficiency responses by promoting auxin signaling in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 170:907-920.

Yuan Y.X., Zhang J., Wang D.W., Ling H.Q. (2005) AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell Research* 15: 613–621.

Zamioudis C., Korteland J., Van Pelt J., Van Hamersveld M., Dombrowski N., Bai Y., Hanson J., Van Verk M., Ling H., Schulze-Lefer P., Pieterse C. (2015) Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *The Plant Journal* 84: 309-322.

Zhai Z., Gayomba S.R., Jung H.I., Vimalakumari N.K., Pineros M., Craft E., Rutzke M., Danku J., Lahner B., Punshon T., Guerinot M.L., Salt D.E., Kochian L.V., Vatamaniuk O.K. (2014) OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26:2249-2264.

Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M.A., Ryu C.M., Allen R., Melo I.S., Paré P.W. (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226:839-851.

Zhang H., Kim M.S., Sun Y., Dowd S.E., Shi H, Pare P.W. (2008) Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:737-744.

Zhang H., Sun Y., Xie X., Kimi M., Dowd S., Paré P. (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The plant Journal* 58:568-577.

Zheng L., Ying Y., Wang L., Wang F., Whelan J., Shou H. (2011) Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*. *BMC Plant Biology* 10: 166-175.

Zhou C., Han L., Wang Z. (2011) Potential but limited redundant roles of MtPIN4, MtPIN5 and MtPIN10/SLM1 in the development of *Medicago truncatula*, *Plant Signaling & Behavior*, 6:11, 1834-1836.