



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

***Trabajo de Tesis Doctoral: Regulación dinámica del
traductoma de *Medicago truncatula* durante la simbiosis
fijadora de nitrógeno***

Tesista: Lic. Soledad Traubenik

Director: Dr. Flavio A. Blanco

Año: 2020



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias
Exactas

**“Regulación dinámica del traductoma de *Medicago truncatula*
durante la simbiosis fijadora de nitrógeno”**

Lic. Soledad Traubenik

Director: Dr. Flavio A. Blanco



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

Laboratorio Biología de la Raíz

UNLP-CONICET

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Flavio Antonio Blanco.

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo de tesis han dado origen a las siguientes publicaciones:

Soledad Traubenik, Mauricio Alberto Reynoso, Karen Hobecker, Marcos Lancia, Maureen Hummel, Benjamin Rosen, Christopher Town, Julia Bailey-Serres, Flavio Blanco, María Eugenia Zanetti. (2019). Reprogramming of root cells during nitrogen-fixing symbiosis entails dynamic polysome association of coding and non-coding RNAs. *The Plant Cell*. DOI:10.1105/tpc.19.00647

Soledad Traubenik, Flavio Blanco, María Eugenia Zanetti and Mauricio A. Reynoso. (2019). TRAP-SEQ of eukaryotic translates applied to the detection of polysome-associated long non-coding RNAs. “RNA tagging: Methods and Protocols” - Springer. En prensa.

Mauricio Alberto Reynoso, Soledad Traubenik, Karen Hobecker, Flavio Blanco and María Eugenia Zanetti. (2019). Post-transcriptional reprogramming during root nodule symbiosis. “The Model Legume *Medicago truncatula*” - Wiley/Blackwell. ISBN: 9781119409168.

Índice

Resumen	1
Introducción	4
1. Regulación de la expresión génica en plantas.....	5
1.1. Niveles de regulación de la expresión génica.....	5
1.2. Regulación de la traducción	8
1.3. Métodos que permiten el estudio de la regulación traduccional	10
1.4. Mecanismos de degradación de RNAs.....	14
1.5. Traducción y decaimiento del RNA.....	15
1.6. Rol del complejo Superkiller en el decaimiento y degradación de mRNAs. .	16
1.7. Función del complejo Superkiller en el silenciamiento post-transcripcional.	19
1.8. Regulación de la expresión génica mediada por RNAs no codificantes	20
1.9. Regulación traduccional mediada por lncRNAs	23
2. Las leguminosas y su importancia ecológica y agronómica	25
3. <i>Medicago truncatula</i> como leguminosa modelo.....	27
4. Simbiosis fijadora de Nitrógeno	28
4.1. Asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios.....	28
4.2. Proceso de infección y organogénesis del nódulo	29
4.3. Bases moleculares de la nodulación	31
5. Aplicación de la técnica de TRAP para el estudio de la regulación traduccional durante la simbiosis.....	34
Hipótesis y objetivos	37
1. Hipótesis y objetivo general.....	38
2. Objetivos específicos	39
Capítulo 1	41
1. Diseño experimental para caracterizar los cambios en el transcriptoma y traductoma durante la simbiosis.....	42
2. Los cambios a nivel transcripcional y traduccional que ocurren en etapas tempranas de la asociación simbiótica exhiben una correlación limitada	46

3. La infección rizobiana introduce cambios en la carga de los mRNAs a los ribosomas	50
4. Regulación de los mRNAs en traductomas específicos de tejido en respuesta a <i>S. meliloti</i>	53
5. Análisis de las variantes alternativas de transcripto reguladas diferencialmente a nivel traduccional en distintos tejidos en respuesta a <i>S. meliloti</i>	57
Capítulo 2	66
1. Caracterización de la expresión de <i>SUPERKILLER3</i> en <i>Medicago truncatula</i>	67
2. <i>SUPERKILLER3</i> no es requerida para el desarrollo de la raíz, pero si para la organogénesis del nódulo.....	71
3. <i>SUPERKILLER3</i> no es requerida para la infección por rizobios.....	75
4. <i>SUPERKILLER3</i> es necesario para la supervivencia de las bacterias dentro de los nódulos.....	77
5. El silenciamiento de <i>SKI3</i> altera la expresión de los genes de nodulación <i>ENDO40</i> y <i>ERN1</i> en respuesta a <i>S. meliloti</i>	79
6. El silenciamiento de <i>SKI3</i> genera cambios en el clivaje dirigido por miRNAs y en la degradación de mRNAs en respuesta a <i>S. meliloti</i>	81
Capítulo 3	88
1. Asociación diferencial de lncRNAs a la maquinaria traduccional en respuesta a <i>S. meliloti</i>	89
2. Los cambios en la asociación de lncRNAs a polisomas en respuesta a <i>S. meliloti</i> están influenciados por el tipo celular	91
3. Análisis funcional del lncRNA Medtr3NC032155.....	94
3.1. Variantes de transcripto de Medtr3NC032155 y su asociación a polisomas en etapas tempranas de la interacción simbiótica	94
3.2. Generación de construcciones para el silenciamiento de <i>PSD</i>	96
3.3. <i>PSD</i> es requerido para la organogénesis del nódulo.....	98
3.4. <i>PSD</i> es necesario para la infección por <i>S. meliloti</i>	100
4. Identificación de <i>targets</i> putativos de <i>PSD</i>	101
Discusión	105
1. Reclutamiento selectivo de mRNAs a la maquinaria traduccional en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.....	106
2. Análisis de transcriptos asociados a la maquinaria traduccional de tipos celulares específicos en respuesta a la inoculación.....	108

3. El análisis de las variantes alternativas de transcripción permitió identificar genes implicados en la adición/remoción de marcas epigenéticas que son regulados a nivel traduccional en respuesta a <i>S. meliloti</i>	109
4. <i>SUPERKILLER3</i> participa del desarrollo y de la supervivencia de las bacterias durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.	111
5. Cambios en la degradación y en el clivaje endonucleolítico de mRNAs en plantas silenciadas en <i>SKI3</i> y en respuesta a <i>S. meliloti</i>	112
6. Asociación diferencial de lncRNAs a la maquinaria traduccional en respuesta a <i>S. meliloti</i>	113
7. El lncRNA <i>POSEIDON</i> es requerido para el proceso de infección y para la organogénesis del nódulo.....	115
8. Consideraciones finales	118
 Materiales y Métodos	119
1. Material biológico	120
1.1. Material vegetal	120
1.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	120
2. Vectores de clonado.....	120
3. <i>Primers</i>	121
4. Medios de cultivo.....	121
5. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico.....	123
5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	123
5.2. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa	123
5.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	124
5.5. Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY	124
5.6. Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 α y TOP10 electrocompetentes.....	124
5.7. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 α y TOP10 electrocompetentes .	125
5.8. Minipreparación de DNA plasmídico.....	125
6. Construcción de plásmidos	125
6.1. Construcción de los plásmidos <i>SKI3</i> RNAi1, <i>SKI3</i> RNAi2, <i>PSD1</i> RNAi y <i>PSD2</i> RNAi para silenciamiento	125
7. Generación de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	126
7.1. Preparación de células de <i>A. rhizogenes</i> Arqua1 electrocompetentes.....	126
7.2. Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> Arqua1 electrocompetentes ...	126

7.3.	Esterilización superficial y germinación de semillas	127
7.4.	Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	127
8.	Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de las plantas compuestas	128
8.1.	Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con <i>S. meliloti</i>	128
8.2.	Análisis de eventos de infección (ITs)	128
8.3.	Cuantificación del número y tamaño de los nódulos.....	129
8.4.	Cuantificación de la longitud de las raíces	129
9.	Purificación de polisomas mediante la técnica de TRAP	129
9.1.	Recolección de tejido y extracción de polisomas.....	129
9.2.	Preparación de las bolillas magnéticas conjugadas a α -FLAG	130
9.3.	Purificación de polisomas.....	130
10.	Extracción y análisis de RNA	132
10.1.	Extracción de RNA a partir de tejido de raíz.....	132
10.2.	Extracción de RNA a partir de muestras Total y TRAP.....	132
10.3.	Tratamiento con DNasa	132
10.4.	Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa.....	133
10.5.	Ensayos de PCR cuantitativa (qPCR).....	133
10.6.	Ensayo de 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	133
11.	Tinción y microscopía.....	134
11.1.	Microscopía electrónica	134
11.2.	Microscopía confocal.....	134
11.3.	Tinción Syto9 / IP.....	134
12.	Preparación de bibliotecas de GMUCT 2.0	134
13.	Análisis bioinformáticos	135
13.1.	Análisis bioinformáticos generales	135
13.2.	Procesamiento y análisis de los datos de RNA Total y TRAP-seq.....	137
13.3.	Procesamiento y análisis de los datos de GMUCT 2.0-seq	138
	Anexo 1. Primers.....	139
	Anexo 2. Abreviaturas.....	142
	Bibliografía.....	147

DVD ADJUNTO

Tabla Suplementaria 1. FPKM, FPKM *mean* y Log2 *Fold Change* de todos los genes expresados en las muestras de RNA Total y RNA TRAP.

Tabla Suplementaria 2. FPKM, FPKM *mean* y Log2 *Fold Change* de todos los transcritos expresados en las muestras de RNA Total y RNA TRAP.

Tabla Suplementaria 3. TEDs en muestras de RNA Total y RNA TRAP.

Tabla Suplementaria 4. Genes inducidos por rizobio identificados en este estudio como GEDs en muestras de RNATotal y RNA TRAP.

Tabla Suplementaria 5. *Ribosome Loading* de todos los genes con FPKM>0.

Tabla Suplementaria 6. Genes con cambio en su *Ribosome loading* en respuesta a *S. meliloti*

Tabla Suplementaria 7. TEDs en muestras de RNA Total y RNA TRAP.

Tabla Suplementaria 8. Picos GMUCT 2.0 acumulados diferencialmente en muestras *SKI3* RNAi y *GUS* RNAi.

Tabla Suplementaria 9. miRNA targets detectados por GMUCT 2.0.

Tabla Suplementaria 10. lncRNAs expresados diferencialmente en muestras de RNA Total y RNA TRAP.

Resumen

La capacidad de las leguminosas de establecer una asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno es de fundamental importancia para la incorporación de nitrógeno en los suelos. Si bien en los últimos años se ha avanzado en la identificación de genes de la planta requeridos para la nodulación, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos moleculares que regulan un proceso complejo, en el que se integran y coordinan la infección de la bacteria, el desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa y las señales del ambiente.

La expresión génica es regulada a múltiples niveles, que involucran eventos nucleares y citoplasmáticos. Los eventos nucleares incluyen la remodelación de la cromatina, la transcripción y el procesamiento del RNA, el control de la calidad de los RNAs y el transporte de los mismos del núcleo al citoplasma. Una vez en el citoplasma, los transcriptos pueden ser traducidos activamente en los polirribosomas, almacenados en complejos ribonucleoproteicos o sometidos a degradación por diferentes mecanismos. El auge de las técnicas asociadas a la transcriptómica ha llevado al uso de los niveles estacionarios de mRNA como criterio para la selección y el estudio de genes con una posible implicancia en caracteres de importancia agronómica. Este enfoque ha excluido los niveles de regulación post-transcripcionales, asociados a una respuesta rápida mediante la activación o represión traduccional de mRNAs preexistentes, así como a la degradación de mRNAs. Este conocimiento es esencial para establecer criterios racionales que permitan optimizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

En el presente trabajo de Tesis se caracterizó a escala genómica la distribución dinámica de la asociación de RNAs mensajeros (mRNAs) y RNAs no codificantes largos (lncRNAs) a la maquinaria traduccional durante las etapas tempranas de la simbiosis. Para ello, se utilizó la técnica *Translating Ribosome Affinity Purification* (TRAP) seguida de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) en raíces de la leguminosa *Medicago truncatula* inoculadas o no con su par simbiótico *Sinorhizobium meliloti*. Un aspecto notable de nuestros resultados fue la limitada correlación entre la regulación a nivel transcripcional y traduccional observada en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, sugiriendo que el

control traduccional contribuye significativamente a la reprogramación de la expresión génica en las células de la raíz comprometidas para la simbiosis. Posteriormente, se evaluaron los niveles de asociación de los mRNAs y lncRNAs a la maquinaria traduccional de tejidos específicos de la raíz involucrados en la formación de nódulos. Este análisis permitió establecer que los cambios de asociación de los RNAs a polisomas están fuertemente determinados por los diferentes tipos de células que participan en las etapas tempranas de la simbiosis.

El análisis de las variantes de transcriptos alternativos asociados diferencialmente a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación nos permitió identificar al transcripto *SUPERKILLER 3 (SKI3)*, el cual codifica una proteína involucrada en la vía de degradación 3'-5'. El silenciamiento de *SKI3* alteró el desarrollo de los nódulos y la supervivencia de las bacterias dentro de los mismos. Un mapeo de los RNAs clivados diferencialmente en plantas silenciadas en *SKI3* o plantas control utilizando la técnica de GMUCT 2.0, permitió identificar al transcripto que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción APETALA2 (*AP2*) como *target* putativo de la vía de degradación mediada por *SKI3*. Dicho *AP2* es el ortólogo putativo de *NNCI*, un represor transcripcional del gen de nodulación *ENOD40*.

Por último, se analizó la dinámica de la asociación de lncRNAs a la maquinaria traduccional durante la simbiosis. Se identificaron lncRNAs que muestran un comportamiento determinado por el tipo celular. Así se identificó al lncRNA intergénico denominado *POSEIDON (PSD)*, el cual disminuye su asociación a la maquinaria traduccional en el córtex de la raíz luego de la inoculación con *S. meliloti*. El silenciamiento de *PSD* alteró tanto los eventos de infección como la organogénesis del nódulo, sugiriendo que este lncRNA podría desempeñar una función regulatoria durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.

El presente trabajo de tesis contribuye a sustentar la relevancia de los niveles de regulación post transcripcional en el control de la expresión génica durante el establecimiento de la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios. Los resultados obtenidos permiten mejorar nuestra comprensión del fenómeno biológico que conduce a la fijación biológica de nitrógeno, a la vez que resultan útiles para aumentar la información en la cual se basa la

selección de genes con potencial utilización en el mejoramiento genético de caracteres agronómicos relevantes en plantas leguminosas.

Introducción

1. Regulación de la expresión génica en plantas

1.1. Niveles de regulación de la expresión génica

La gran mayoría de los procesos biológicos involucran cambios en la expresión génica, tanto durante el desarrollo como en la respuesta a estímulos internos y externos. El control de la expresión génica es un proceso dinámico que es finamente regulado en múltiples niveles. Cambios en la estructura de la cromatina, modificaciones epigenéticas, regulación de la transcripción, degradación y metabolismo del RNA, traducción y finalmente modificación post-traducciona l y degradación de proteínas son procesos celulares fundamentales involucrados en el control de la expresión génica. En los organismos eucariontes, el DNA se encuentra asociado a proteínas, lo que genera un estado reprimido de la información genética asociado a la topología de la cromatina. El posicionamiento de los nucleosomas, así como los patrones de metilación y acetilación de histonas y la metilación de citosinas por la acción de las DNA metiltransferasas determinan en forma dinámica el estado de compactación de la cromatina, condicionando la accesibilidad de los factores de transcripción al DNA (Li *et al.*, 2007; Lauria and Rossi 2011; Deal and Henikoff 2011). La activación de la expresión génica tiene entonces una primera etapa de desrepresión de los genes que se complementa por la activación de la transcripción a través de la acción de factores de transcripción que actúan en *trans* sobre sus genes *target*, reconociendo secuencias en los promotores que actúan en *cis* (Lelli *et al.*, 2012). Los factores de transcripción participan en el reclutamiento y activación de las RNA polimerasas DNA dependientes I, II y III (RNA Pol I, II y III), que sintetizan los transcriptos primarios. En eucariontes, los RNAs mensajeros (mRNAs por *messenger RNAs*) son transcriptos por la RNA Pol II. El mRNA precursor (pre-mRNA) es modificado cotranscripcionalmente por la adición de un *cap* de 7-metilguanosina en el extremo 5' mediante un enlace 5-5-trifosfato (m7GpppN) que estabiliza al mRNA (Bailey-Serres *et al.*, 2009), y por la remoción cotranscripcional de intrones producida por el complejo del spliceosoma (Lee *et al.*, 2015). Posteriormente, ocurre el clivaje endonucleolítico del mRNA, y la adición de múltiples adenosinas (poliA) en el extremo 3' (Figura 1A). Esta cola de entre 50 y 200 adenosinas protege al transcripto de la degradación y promueve su

exportación al citoplasma y su asociación a la maquinaria traduccional (Cramer *et al.*, 2004; Shatkin *et al.*, 2000; Fisher and Beal, 2018). Los pre-mRNAs que contienen intrones, ya sea en la región codificante como en las regiones 3' o 5' no traducidas (UTR por *Untranslated Region*), pueden sufrir *splicing* alternativo para dar lugar a la producción de múltiples isoformas de transcripto a partir de un mismo gen, aumentando así la complejidad del transcriptoma y del proteoma en los diferentes tipos celulares, en diferentes etapas del desarrollo o en condiciones ambientales variables (Figura 1A). En cada una de estas etapas del procesamiento, el mRNA se asocia a proteínas de unión a RNA (RBP por *RNA Binding Protein*); la proteína de unión al *cap* 5' (CBP), las proteínas de unión a poliA (PABPs, por *polyA Binding Proteins*) y otros tipos de RBPs, formando así complejos ribonucleoproteicos (RNPs) (Lorkovic *et al.*, 2009). Estos mRNAs asociados a proteínas son exportados a través de los poros nucleares al citoplasma. Allí son sometidos a una primera ronda de traducción que funciona como control de calidad del mRNA (Figura 1B) y que determina su destino celular: aquellos mRNAs que pasan el control de calidad son traducidos activamente a proteínas (Figura 1C) o almacenados en RNPs traduccionalmente inactivos, mientras que los transcriptos que no presentan un marco abierto de lectura son generalmente degradados a través del mecanismo de *non-sense mediated decay* (NMD), (Figura 1D). Las proteínas asociadas al 5' *cap* y al 3' poliA interaccionan de forma que el mRNA adquiere una estructura circular, lo que hace más eficiente la re-asociación de los ribosomas al codón de inicio luego de finalizar la traducción, favoreciendo de esta manera la reiniciación de la traducción (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). Una vez sintetizada, la proteína puede ser procesada mediante modificaciones post-traduccionales, transportada, ensamblada dentro de complejos multiproteicos o degradada. Algunos niveles de regulación de la expresión génica son mediados por pequeños RNAs (sRNAs por *small RNAs*), incluyendo microRNAs (miRNAs) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs por *small interference RNAs*), los cuales pueden actuar tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. A nivel transcripcional, los sRNAs promueven cambios en el estado de metilación del DNA, afectando el estado de compactación de la cromatina e interfiriendo así con la transcripción de sus genes *target*. A nivel post-transcripcional, los sRNAs actúan clivando el mRNA *target*, inhibiendo su traducción o acelerando su decaimiento (Bartel *et al.*, 2009). Por lo tanto, la expresión de los genes

puede ser modulada a distintos niveles que abarcan la síntesis y el procesamiento de los mRNAs, su transporte al citoplasma, su agrupamiento en complejos RNPs involucrados en la traducción, almacenamiento o degradación, así como también la síntesis de proteínas y sus modificaciones post-traduccionales. Estos mecanismos regulatorios proveen plasticidad y adaptabilidad a las células vegetales en un entorno cambiante.

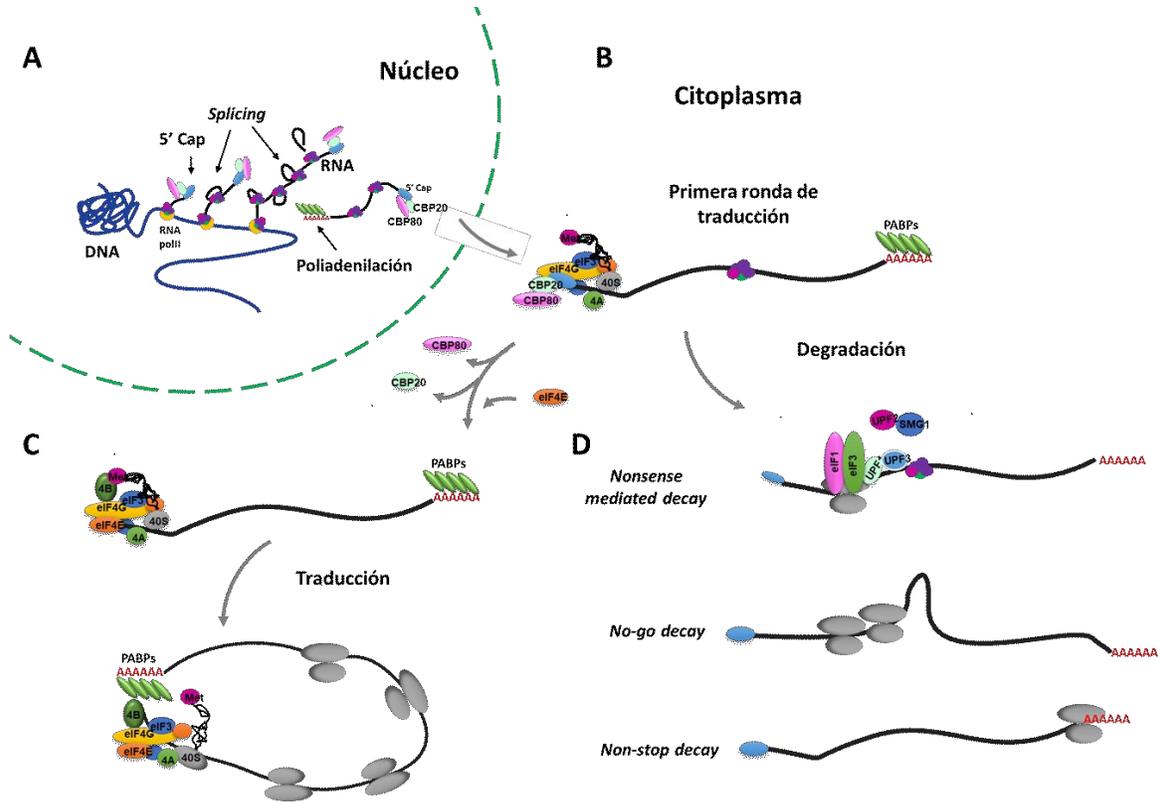


Figura 1. Regulación de la expresión génica. **A.** El pre-mRNA producto de la transcripción es procesado mediante la adición de un *cap* (m7GpppN) al extremo 5', la remoción de intrones a través del *splicing*, el clivaje y la poliadenilación del extremo 3'. Durante su procesamiento, el mRNA se asocia a las proteínas de unión a RNA CBP20/CBP80 en el extremo 5' y a proteínas de unión a poliA, PABPs, en el extremo 3'. **B.** En el citoplasma, los transcritos maduros se asocian con el complejo de pre-iniciación, compuesto por la subunidad ribosomal 40S, los factores de iniciación de la traducción (eIF 4E, 4G, 4A, 4B, 3, 1, 1A, 2 y 5), el Met-tRNA, y las PABPs y atraviesan una primera ronda de traducción como control de calidad. **C.** Los mRNAs que superan este control de calidad se asocian a múltiples ribosomas (polisomas) para entrar en traducción activa. La interacción de PABP con eIF4G produce la circularización del mRNA, la cual promueve la iniciación y re-iniciación de la traducción. **D.** Aquellos mRNAs que presentan un codón *stop* prematuro o estructuras secundarias muy estables son degradados a través de los mecanismos de control *nonsense mediated decay* o *no-go decay*, respectivamente; mientras que los mRNAs que carecen de un codón *stop* son degradados vía el mecanismo de *non-stop decay*. Adaptado de Chantarachot and Bailey-Serres, 2017.

1.2.Regulación de la traducción

El control de la traducción es un mecanismo que le permite a la célula activar o reprimir rápidamente la traducción de mRNAs sintetizados previamente en respuesta a señales tanto endógenas como exógenas, sin la necesidad de una transcripción *de novo*, permitiendo cambios rápidos en las concentraciones celulares de las proteínas. Este mecanismo proporciona flexibilidad y adaptabilidad a los organismos eucariotas, mantiene la homeostasis y modula cambios permanentes en la fisiología y la determinación de linajes celulares (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Merchante *et al.*, 2017). El proceso de traducción se puede dividir en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclado de ribosomas. Si bien existen ejemplos de regulación en todos los pasos (Onouchi *et al.*, 2008), la regulación traduccional se ejerce principalmente en la iniciación, donde el codón de inicio AUG es reconocido por el tRNA Metionina (Met-tRNA) (Kawaguchi and Bailey-Serres 2002; Bailey-Serres *et al.*, 2009). El proceso se inicia cuando el mRNA se asocia al complejo de preiniciación, formado por los factores de iniciación eIFs (por *eukaryotic initiation factors*). El factor de iniciación eIF4F reconoce la estructura m⁷G *cap* en el extremo 5' del mRNA y eIF4B desestabiliza la estructura secundaria de la región próxima al *cap* preparando al mRNA para la unión del ribosoma (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). El factor de iniciación eIF4F está formado por la proteína de unión al *cap* eIF4E, la helicasa de RNA eIF4A, y la proteína eIF4G que se asocia a eIF4E y eIF4A e interacciona con proteínas PABPs en el extremo 3' (Pestova and Kolupaeva, 2002). Esta interacción entre los eIFs y PABPs promueve la circularización del mRNA, estimulando la iniciación de la traducción y facilitando el reciclado de ribosomas en las subsecuentes rondas de traducción. Asimismo, el complejo ternario de GTP, eIF2 y el Met-tRNA, complementario a AUG, se asocia a la subunidad ribosomal 40S, que contiene a eIF3, eIF1y eIF1A, formando así el complejo de pre-iniciación. A su vez, eIF4G se asocia con eIF3, lo que permite la unión del complejo de preiniciación al mRNA en el extremo 5'. El complejo posicionado escanea la región 5' UTR en sentido 5' a 3' hasta que alcanza el codón de iniciación, en un proceso conocido como *scanning*. Este proceso de *scanning* permite la desestabilización de la estructura secundaria y el avance del complejo eIF1 y eIF1A, los cuales participan del reconocimiento del codón de iniciación (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Cuando el complejo de preiniciación reconoce un codón AUG en el

contexto adecuado, se une la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S y comienza la etapa de elongación. Posteriormente, la carga de ribosomas adicionales forma complejos polirribosomales (mRNAs con dos o más ribosomas), conocidos con el nombre de polisomas (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Browning and Bailey-Serres, 2015). Por lo tanto, la cuantificación de la población de mRNAs asociados a la maquinaria traduccional, denominada traductoma, proporciona una buena estimación del estado traduccional de los mRNAs.

El control traduccional puede afectar a la mayoría de los mRNAs celulares o actuar a nivel específico, afectando sólo a un subconjunto de mRNAs (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Roy and von Armin, 2013). La represión global de la iniciación de la traducción ha sido observada en respuesta a la limitación de nutrientes y otras condiciones de estrés que reducen la disponibilidad de ATP, como por ejemplo la privación de oxígeno (Branco-Price *et al.*, 2008), el *shock* térmico (Merret *et al.*, 2017), la sequía (Kawaguchi *et al.*, 2004) o la deficiencia de sacarosa (Nicolai *et al.*, 2006). Sin embargo, si bien estas situaciones de estrés reducen globalmente la traducción, existen mecanismos especializados que regulan la traducción de mRNAs específicos, los cuales son capaces de evadir esta represión y mantener o, en ciertos casos, aumentar su asociación a polisomas. Como ejemplos pueden mencionarse el enriquecimiento de mRNAs que codifican factores de transcripción y proteínas de señalización en traductomas específicos de tejido en respuesta a hipoxia (Mustroph *et al.*, 2009), o la asociación selectiva a la maquinaria traduccional de mRNAs que codifican proteínas de respuesta a estrés por falta de oxígeno (Juntawong *et al.*, 2014). Estudios a escala genómica sobre la asociación de mRNAs individuales a polisomas pusieron en evidencia la selectividad del proceso traduccional, enfatizando la importancia de la regulación de la traducción en la expresión génica (Kawaguchi *et al.*, 2004; Zanetti *et al.*, 2005; Branco-Price *et al.*, 2008). A partir de este tipo de estudios fue posible identificar características particulares de los transcriptos que pueden influenciar la traducción. Estos mecanismos de traducción selectiva de ciertos RNAs pueden involucrar proteínas de unión a RNA (Juntawong *et al.*, 2014; Sorenson and Bailey-Serres, 2014), la presencia de pequeños marcos abiertos de lectura río arriba del marco abierto de lectura principal (uORFs por *upstream Open Reading Frames*), como es el caso de estrés por falta de oxígeno (Juntawong *et al.*, 2014), y también la acción de complejos ribonucleoproteicos

conteniendo miRNAs (Li *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016), y RNA no codificantes (ncRNAs) (Jiao and Meyerowitz, 2010; Carrieri *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2012; Jabnourne *et al.*, 2013; Juntawong *et al.*, 2014, Bazin *et al.*, 2017; Deforges *et al.* 2019). Todos estos antecedentes refuerzan la idea de que la asociación diferencial de los RNAs a la maquinaria traduccional es un mecanismo crucial en el control de la expresión génica de la respuesta a situaciones de estrés.

1.3.Métodos que permiten el estudio de la regulación traduccional

Los cambios en los niveles estacionarios de mRNA han sido tradicionalmente usados como criterio para la selección y el estudio de genes con una posible implicancia en caracteres de importancia agronómica, tendencia que se ha acentuado a partir del desarrollo de nuevas tecnologías asociadas al estudio de los transcriptomas. Este enfoque ha excluido los niveles de regulación post-transcripcional, asociados a una respuesta rápida mediante la activación o inhibición de la traducción de mRNAs preexistentes. Los niveles estacionarios de mRNAs sólo se correlacionan parcialmente con la composición del proteoma, lo que indica que los mecanismos de regulación post-transcripcional, incluyendo la traducción del mRNA, juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Para poder alcanzar una mayor comprensión de los procesos que determinan la asociación diferencial de los RNAs a la maquinaria traduccional se requiere de tecnologías que permitan aislar y discriminar este subgrupo de RNAs. Una técnica que permite investigar este nivel de regulación es aquella basada en la inmunopurificación de RNA (RIP, por *RNA immunopurification*). Esta metodología permite acceder a las poblaciones de RNAs específicos asociados a una RBP determinada. Ejemplos de RIP incluyen aquellos llevados a cabo con las proteínas PABP o eIF4E, que se unen a los mRNAs poliadenilados o al *cap* del extremo 5' de los mRNAs, respectivamente (Tenenbaum *et al.*, 2000; Tenenbaum *et al.*, 2002). La regulación traduccional de los mRNAs puede monitorearse examinando su dinámica de asociación a los ribosomas. El número de ribosomas cargados en un transcripto es representativo del balance de las velocidades de iniciación, elongación y terminación de la traducción. Los mRNAs que reclutan múltiples ribosomas forman polisomas. La asociación de los mRNAs a los ribosomas y polisomas puede evidenciarse

mediante la centrifugación y fraccionamiento diferencial de los complejos ribosomales en gradientes de densidad de sacarosa seguido del análisis de las poblaciones de mRNAs en las diferentes fracciones (Tzamarias *et al.*, 1989). La ultracentrifugación diferencial en gradientes de sacarosa es el método tradicionalmente utilizado para la separación y purificación de complejos mRNA-ribosomas de diferente tamaño basándose en sus coeficientes de sedimentación y ha sido ampliamente utilizado para examinar la regulación traduccional, tanto en plantas como en mamíferos, levaduras y bacterias (Branco-Price *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2013). La interacción entre los ribosomas y los mRNAs se preserva utilizando inhibidores de la elongación de la traducción, tales como la cicloheximida, y los extractos citosólicos se separan en gradientes de densidad de sacarosa por ultracentrifugación. El fraccionamiento subsiguiente de los gradientes permite el aislamiento de RNAs de acuerdo con el número de ribosomas que se unen a ellos (Figura 2A y 2B).

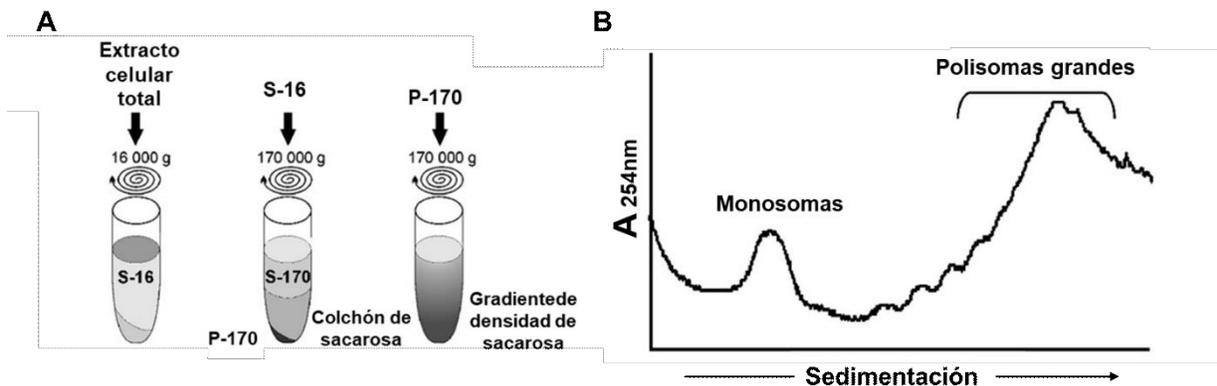


Figura 2. Ultracentrifugación diferencial de polisomas en gradientes de densidad de sacarosa. A. Para obtener los ribosomas/polisomas y los mRNAs unidos a ellos se preparan extractos celulares totales resultantes de la homogenización del tejido en un buffer que mantiene la integridad de los polisomas seguido de una centrifugación a 16.000 g, recogiendo el sobrenadante de dicha centrifugación (S-16). Este extracto se somete a una ultracentrifugación en un colchón de sacarosa para obtener el sobrenadante post-ribosomal (S-170) y el precipitado conteniendo las partículas ribosomales (P-170). P-170 es resuspendido y fraccionado por ultracentrifugación diferencial en gradiente de densidad de sacarosa. B. Perfil de absorbancia a 254 nm (A_{254}) correspondiente a las fracciones obtenidas luego de la centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. Se indican las posiciones correspondientes a monosomas y polisomas grandes (≥ 5 ribosomas). Adaptado de Reynoso *et al.*, 2013.

El fundamento de este método de separación lleva a que las muestras de polisomas purificadas contengan también otros complejos de alto coeficiente de sedimentación, tales como pseudo-polisomas, cuerpos de procesamiento y gránulos de almacenamiento, entre otros mRNPs (Fleischer *et al.*, 2006; Thermann and Hentze, 2007; Halbeisen and Gerber, 2009). Más recientemente, se han desarrollado métodos basados en la purificación por afinidad o inmunopurificación de ribosomas en activa traducción (*TRAP*, por *Translating Ribosome Affinity Purification*). Esta técnica, basada en la expresión de una proteína ribosomal fusionada a un epítopo FLAG, permite la purificación por afinidad de los ribosomas y mRNAs unidos a ellos utilizando un anticuerpo antiFLAG conjugado a bolillas magnéticas (Figura 3). La técnica de TRAP fue desarrollada primeramente para la purificación de ribosomas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante la fusión de la proteína ribosomal de la subunidad grande RPL25 (por *Ribosomal protein large subunit 25*), a un epítopo FLAG-His (Inada *et al.*, 2002). En plantas, la técnica de TRAP fue implementada para llevar adelante la purificación de ribosomas en *Arabidopsis thaliana* (Zanetti *et al.*, 2005). En este caso se utilizó la proteína ribosomal RPL18 de la subunidad 60S fusionada en su N-terminal a un epítopo dual His-FLAG. El uso de una proteína ribosomal de la subunidad 60S asegura que los mRNAs purificados en estos complejos contengan, al menos, un ribosoma 80S que superó la etapa de preiniciación. El desarrollo de este método ha facilitado la purificación y análisis de los mRNAs asociados a la maquinaria traduccional. La técnica de TRAP fue adaptada y utilizada también para caracterizar los traductomas de determinados tipos celulares mediante el uso de promotores que dirigen la expresión de la proteína FLAG-RPL18 en forma específica de tejido (Mustroph *et al.*, 2009; Jiao and Meyerowitz, 2010). Este sistema permite la cuantificación del estado traduccional de los mRNAs en cada tipo celular. En los últimos años, numerosos estudios destacaron la importancia del control traduccional de la expresión génica durante procesos de desarrollo tales como la germinación de semillas (Basbous-Serhal *et al.*, 2015), el crecimiento del tubo polínico (Hofmann, 2014) y la floración (Jiao and Meyerowitz, 2010) o la adaptación a factores ambientales tales como la sequía (Kawaguchi *et al.*, 2004), hipoxia (Branco-Price *et al.*, 2008; Mustroph *et al.*, 2009; Juntawong *et al.*, 2014), transiciones de luz a oscuridad (Juntawong and Bailey-Serres, 2012; Missra *et al.*, 2015), estrés térmico (Merret *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017), baja temperatura (Juntawong

et al., 2014), deficiencia de fosfato (Bazin *et al.*, 2017) y ataque de patógenos (Meteignier *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

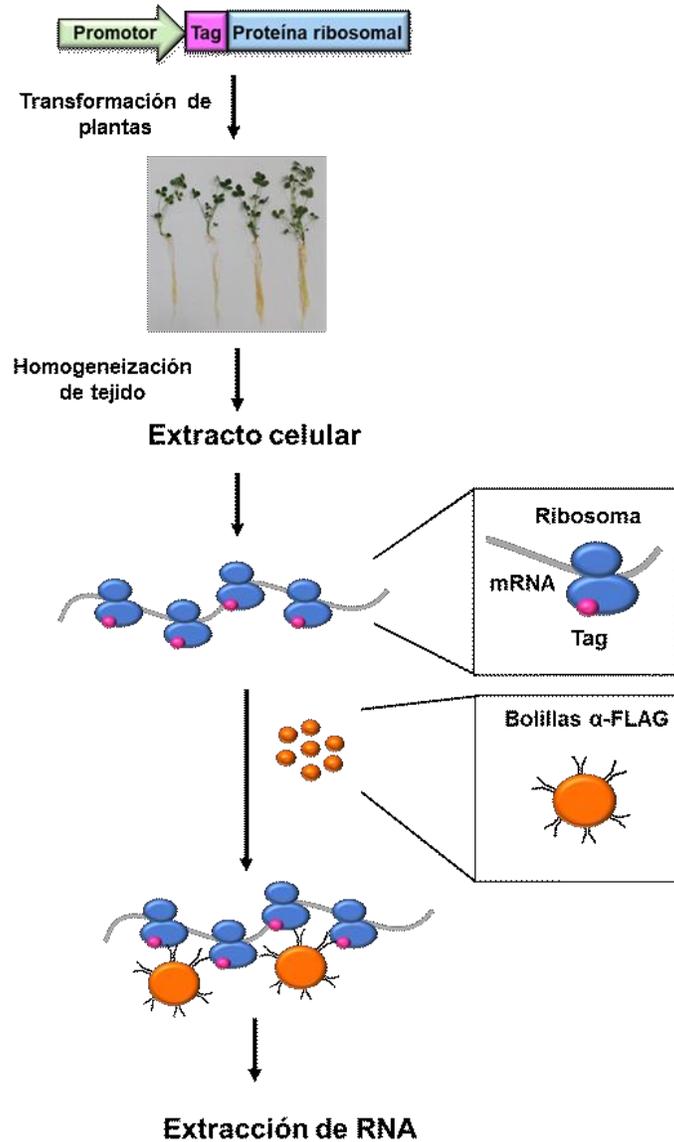


Figura 3. Purificación por afinidad de ribosomas en activa traducción (TRAP). La técnica de TRAP hace uso de la expresión de una proteína ribosomal fusionada a un epítopo FLAG. Luego de la homogeneización del tejido, los RNAs asociados a polisomas son capturados por el anticuerpo α -FLAG unido covalentemente a bolillas magnéticas o de agarosa. Las bolillas son colectadas y lavadas para proceder luego a la extracción de RNA.

1.4.Mecanismos de degradación de RNAs

La degradación de los mRNAs juega un rol de gran importancia en la regulación post transcripcional de la expresión génica. Las células eucariotas poseen una amplia variedad de mecanismos que les permiten detectar anomalías en los transcritos y diversas enzimas para degradarlos. Esta maquinaria de degradación se ocupa en primer lugar de los transcritos aberrantes que no son capaces de cumplir su función adecuadamente, es decir, mRNAs que no fueron correctamente procesados por la maquinaria de *splicing* o aquellos que no tienen *cap* en el 5' o cola poliA en el 3'. En el caso de mRNAs que van a ser traducidos a proteínas, esto generalmente involucra la incapacidad de ser traducidos correctamente, como es el caso de mRNAs que poseen un codón *stop* prematuro (Pulak *et al.*, 1993). Múltiples controles de calidad a los que están sujetos los mRNAs dependen de una traducción inicial. Como se mencionó anteriormente, cuando los ribosomas se detienen por la presencia de un codón *stop* prematuro, o de estructuras secundarias que bloquean su progresión a lo largo del mRNA, se desencadena su degradación a través de los mecanismos de control NMD o *no-go decay*, (NGD), respectivamente; mientras que aquellos mRNAs que carecen de un codón *stop* son degradados vía el mecanismo de *non-stop decay* (NSD) (Kerenyi *et al.*, 2008; Shoemaker *et al.*, 2012).

Además de los mecanismos de degradación asociados al control de calidad (*surveillance*), existen otras vías de decaimiento que afectan a todos los RNAs. Si bien algunos RNAs como los RNAs ribosomales (rRNAs) y los RNA de transferencia (tRNAs) son extremadamente estables, los mRNAs y los RNAs que cumplen funciones regulatorias suelen tener vidas medias más cortas. Estos mecanismos de degradación de RNA están sujetos a sistemas regulatorios que pueden actuar en respuesta a estímulos, modificando en forma rápida la estabilidad de los RNAs. Este nivel regulatorio confiere versatilidad y adaptabilidad en ambientes cambiantes (van Hoof *et al.*, 2011). Los mecanismos moleculares que actúan en el decaimiento de los RNAs incluyen la acción de endoribonucleasas, que inician el proceso de degradación a través del clivaje del RNA, y exoribonucleasas, que digieren el RNA a partir de los extremos. Estas nucleasas, a su vez, son activadas mediante diversos procesos. Para prevenir una degradación indiscriminada, estos mecanismos dependen de numerosas proteínas y RNAs no codificantes (ncRNAs)

que actúan en *trans*, los cuales reclutan específicamente las enzimas de degradación correspondientes a cada RNA *target* (Łabno *et al.*, 2016).

Para la mayoría de los transcritos citoplasmáticos, el acortamiento de la cola poliA por la acción de las poliA 3' exonucleasas (deadenilasas) es el paso inicial del proceso de degradación. El acortamiento de la cola de poliA desencadena la subsecuente remoción de la 5' 7-metilguanosina *cap* por la actividad de la enzima *decapping protein 2* (DCP2), la cual en presencia de cationes divalentes Mg^{+2}/Mn^{+2} libera 7mGDP y deja el extremo 5' del RNA monofosforilado (Muhlrad *et al.*, 1999; Arribas-Layton, 2013). En *A. thaliana*, DCP1 y VARICOSE (VCS)/ENHANCER OF mRNA DECAPPING 4 (EDC4) modulan la actividad de DCP2 (Xu *et al.*, 2006). La remoción del *cap* es seguida de una degradación en la dirección 5'-3' a cargo de exoribonucleasas citoplasmáticas; en el caso de plantas este proceso está a cargo de la enzima XRN4 (Kastenmayer and Green, 2000; Gy *et al.*, 2007). Alternativamente, un complejo multiproteico denominado exosoma es capaz de degradar el remanente de la cola poliA y continuar en dirección 3'-5' hacia la región central del RNA (Łabno *et al.*, 2016). Si bien los procesos de deadenilación y *decapping* han sido considerados por mucho tiempo como eventos consecutivos, proveyendo accesibilidad a los extremos del mRNA a la exoribonucleasas, es hoy sabido que la remoción del 5' *cap* y el acortamiento de la cola poliA son procesos que ocurren en forma sincrónica (Caponigro and Parker, 1995; Collier *et al.*, 1998).

1.5. Traducción y decaimiento del RNA

El control traduccional de un mRNA está estrechamente conectado con su decaimiento en el citoplasma. Luego de la síntesis, el procesamiento y su exportación desde el núcleo, las moléculas de mRNA pueden ser traducidas a proteínas o polipéptidos, o ser sustratos de procesos de degradación. Algunas moléculas de mRNA son muy estables a pesar de no ser traducidas, mientras que otras de vida media muy corta son traducidas eficientemente. Sumado a esto, ciertas moléculas de mRNA pueden ser activamente traducidas, silenciadas a nivel traduccional o ser marcadas para decaimiento, experimentando transiciones entre estos diferentes estados en función de estímulos ambientales (Roy and Jacobson, 2013). Los controles de calidad a los que están sujetos los mRNAs dependen de una traducción

inicial. La interacción entre eIFs y PABPs promueve la circularización del mRNA, estimulando la iniciación de la traducción y previniendo su degradación. Mutaciones en los genes que codifican los factores de iniciación eIF4E o eIF4G, aceleran la deadenilación y el subsecuente *decapping*, sugiriendo que la desestabilización de la estructura circular de mRNA aumenta la accesibilidad de los factores de decaimiento (Parker *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2000). La interacción entre los procesos de traducción y decaimiento de mRNAs es evidente en los mecanismos de NMD, NGD y NSD, pero la conexión entre ambos procesos se refleja también en el hecho de que el uso de codones tiene cierto impacto en la rapidez con la que el mRNA es degradado; mRNAs con uso de codones óptimo tienen mayor vida media, mientras que aquellos formados por codones subóptimos experimentan una traducción más lenta y son significativamente menos estables (Presnyak *et al.*, 2015). Los mRNAs traducionalmente inactivos son propensos a sufrir deadenilación y luego ser degradados por las vías de degradación 3'-5' y 5'-3' (Chantarachot and Bailey-Serres, 2018). Por lo tanto, diversos mecanismos de degradación de mRNAs actúan de forma coordinada y/o secuencial sobre mRNAs reprimidos traducionalmente, contribuyendo al control general de la expresión génica.

1.6. Rol del complejo Superkiller en el decaimiento y degradación de mRNAs.

La deadenilación conduce a la remoción de las proteínas PABPs, liberando el 5' *cap* de su interacción con la cola poliA 3', permitiendo así el ataque de las exoribonucleasas que actúan en el sentido 3'-5'. En eucariontes, la actividad exoribonucleasa 3'-5' es llevada a cabo principalmente por el exosoma, un complejo de múltiples subunidades proteicas conservadas que degrada una variedad de sustratos de RNA. El exosoma es parte de varios mecanismos de degradación de RNAs, siendo un efector clave en los mecanismos de control NMD, NGD y NSD, en la degradación de fragmentos de RNA derivados del clivaje endonucleolítico (Orban and Izaurralde, 2005), y en el decaimiento normal de RNAs, manteniendo la abundancia y la correcta homeostasis de los mismos (Gallie *et al.*, 2014; Łabno *et al.*, 2016; Zinder and Lima, 2017). En *A. thaliana*, el complejo del exosoma está formado por nueve subunidades. Seis de ellas tienen actividad ribonucleasa (RIBOSOMAL RNA PROCESSING PROTEIN 41 (RRP41), RRP42, RRP43, RRP45,

RRP46 y RRP41L/MTR3) y forman un núcleo que es estabilizado por la unión de las tres subunidades restantes (RRP4, RRP40 y CSL4), las cuales presentan dominios S1/KH de unión a RNA (Lange and Gagliardi, 2010). La funcionalidad del exosoma depende de la actividad previa del complejo citoplasmático auxiliar Superkiller (SKI), un heterotetrámero compuesto por la helicasa dependiente de ATP SKI2, la subunidad SKI3, que posee repeticiones de tetratricopéptido y funciona como andamio (*scaffold*) y el dímero SKI8, una proteína que contiene dominios WD40, los cuales típicamente median interacciones proteína-proteína (Stirnemann *et al.*, 2010) (Figura 4). El brazo C-terminal de SKI3 y las dos subunidades SKI8 posicionan a SKI2 en el centro del complejo, mientras que el brazo N-terminal de SKI3 modula la actividad helicasa de SKI2. Este complejo SKI despliega la estructura tridimensional de los mRNAs y los guía al complejo del exosoma para su posterior degradación (Halbach *et al.*, 2013). Los genes del complejo SKI fueron inicialmente descubiertos en *S. cerevisiae* a partir de mutaciones que causaban la sobreexpresión de la toxina *killer* del virus de RNA doble cadena L-A integrado en varias cepas de levadura (Toh-E *et al.*, 1978). Se evidenció luego que el complejo SKI controla la propagación del virus, probablemente al degradar el mRNA de esta toxina debido a la ausencia de 5' *cap* y cola poliA (Ridley *et al.*, 1984). En *S. cerevisiae*, la delección de los genes *Superkiller* es letal cuando el mecanismo de degradación 5'-3' tampoco es funcional (Halbach *et al.*, 2013). El complejo Superkiller-exosoma de levaduras posee también la proteína SKI7, la cual actúa como un nexo entre el complejo SKI y el exosoma (van Hoof *et al.*, 1999). SKI7 es necesaria para la degradación 3'-5' y actúa de la misma forma que el complejo SKI, ya que la delección de *SKI7* causa el mismo fenotipo que la delección de *SKI2*, *SKI3* o *SKI8*. De todas maneras, el complejo Superkiller se mantiene intacto en los mutantes *SKI7*, sugiriendo que esta proteína no forma parte de dicho complejo ni es necesaria para la correcta formación del mismo (Brown *et al.*, 2001).

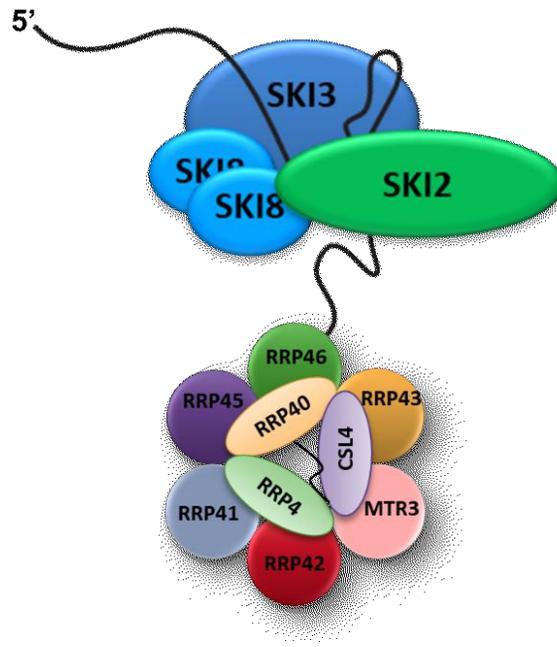


Figura 4. Representación esquemática del exosoma y el complejo Superkiller. Complejo del Exosoma formado por sus nueve subunidades; RRP41, RRP42, RRP43, RRP45, RRP46, MTR3, RRP4, RRP40 y CSL4 interactuando a través de un mRNA con el complejo Superkiller, compuesto por SKI2, SKI3 y el dímero SKI8.

En *A. thaliana*, SKI2, SKI3 y SKI8 forman un complejo citoplasmático estable *in vivo*, y, al igual que ocurre con el complejo del exosoma, todas las subunidades son necesarias para una correcta degradación 3'-5' (Dorcey *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Zhao and Kunst, 2016). La evidencia de asociación estructural de las proteínas AtSKI fue primeramente dada por Dorcey *et al.*, (2012), quien co-inmunoprecipitó AtSKI2 y AtSKI3 con AtSKI8. Luego Zhang *et al.* (2015) confirmó la interacción directa entre AtSKI2 y AtSKI3 mediante un experimento de *pull-down*, así como también identificó la proteína AtSKI7 que, al igual que en *S. cerevisiae*, no es necesaria para la correcta formación del complejo SKI, ni hay evidencia de que interactúe con él ni sea parte del mismo. El homólogo de SKI8 en *A. thaliana*, llamado VERNALIZATION INDEPENDENT 3 (VIP3), es necesario para el normal desarrollo y floración de la planta. Esta proteína tiene una localización tanto citoplasmática, formando parte de complejo SKI, como nuclear, interactuando con el complejo Paf1, el cual está involucrado en la regulación transcripcional y la modificación

de histonas (Dorcey *et al.*, 2012; Takagi and Ueguchi, 2012). Los mutantes *AtSKI2* presentan un fenotipo similar al de los mutantes *AtSKI8*, pero sin que se afecte la floración (Dorcey *et al.*, 2012). La disrupción de las vías de degradación 5'-3' y 3'-5' por pérdida de función de *SKI2* y *EIN5* (*Ethylene Insensitive 5*, la cual codifica una exorribonucleasa citoplasmática 5'-3') en la doble mutante *ski2/ein5* es letal en el estadio embrionario o arresta el desarrollo de las plantas en etapas muy tempranas, producto de serios desordenes de crecimiento, tales como defectos en los meristemas y en la coloración de las hojas (Zhang *et al.*, 2015). Estos resultados ponen en evidencia que la funcionalidad de la vía de degradación 3'-5' depende de la actividad del complejo SKI, y la importancia de dicho complejo para el desarrollo y la reproducción de las plantas.

1.7. Función del complejo Superkiller en el silenciamiento post-transcripcional

El silenciamiento post-transcripcional (PTGS, por *Post-Transcriptional Gene Silencing*) incluye la acción de siRNAs que son parte del sistema inmune de la planta contra DNAs o RNAs foráneos y de miRNAs que regulan la expresión de genes endógenos (Cogoni and Macino 2000; Wilson *et al.*, 2013). El mecanismo de PTGS es disparado por RNAs doble cadena, los cuales son clivados por acción de las proteínas Dicer en pequeños dúplex de RNA. Estos sRNAs luego reprimirán la expresión de sus genes *target*, ya sea mediante el clivaje endonucleolítico o la represión traduccional de los mRNAs (Wilson *et al.*, 2013). Las plantas poseen RNA polimerasas RNA dependientes (RDRPs), las cuales, luego del primer clivaje de un siRNA o miRNA, son capaces de producir siRNAs secundarios, amplificando el efecto del PTGS (Ghildiyal and Zamore, 2009). El PTGS es un mecanismo extremadamente regulado, en el que componentes de la vía de control de calidad, decaimiento y degradación de los mRNAs están involucrados (Gazzani *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2013). Cuando los mecanismos de decaimiento están interrumpidos o sobrecargados por la sobreexpresión de genes, tanto exógenos como endógenos, los transcriptos son guiados a la vía del PTGS, la cual produce siRNAs de entre 21 y 22 nucleótidos. El PTGS de genes exógenos aumenta en ausencia de los mecanismos normales de degradación 5'-3' y 3'-5' (Zhang *et al.*, 2015). Por lo tanto, los mecanismos de

decaimiento de mRNAs establecen un umbral de niveles estacionarios tal que aquellos genes exógenos o ampliamente expresados sean silenciados por este mecanismo.

Zhao and Kunst, (2016) demostraron que el mutante en la subunidad del exosoma *AtRRP45 ECERIFERUM7 (CER7)* presenta niveles aumentados del transcripto *CER3* (relacionado con la deposición de cera cuticular en plantas de *A. thaliana*) respecto de las plantas *wild type*. La incapacidad del exosoma de degradar *CER3* en los mutantes *cer7* genera una gran producción de siRNAs y un eficiente PTGS de *CER3*. La eficiencia del PTGS se encuentra disminuida tanto en los mutantes individuales en los genes *AtSKI2*, *AtSKI3* y *AtSKI8*, así como también en los mutantes dobles de los genes *AtSKI2/CER7*, *AtSKI3/CER7* y *AtSKI8/CER7* comparada con los mutantes en el gen *CER7*, probablemente porque en ausencia de un complejo SKI funcional, los transcriptos *CER3* son degradados por la vía 5'-3'. Esto identifica al PTGS como un mecanismo general de control de los niveles estacionarios de transcriptos endógenos abundantes, el cual es activado cuando la vía de degradación 3'-5' no es funcional. La disminución de la eficiencia del PTGS en las plantas mutantes simples *ski* y dobles *ski/cer7* comparados con los mutantes simples *cer7* sugiere que un complejo SKI funcional es necesario para un correcto control de los niveles de mRNAs mediante el mecanismo de PTGS (Zhao and Kunst, 2016).

1.8.Regulación de la expresión génica mediada por RNAs no codificantes

Los RNA no codificantes (ncRNAs) constituyen un grupo heterogéneo de RNAs que incluye los rRNAs, tRNAs, RNAs nucleares y nucleolares (snRNAs y snoRNAs, respectivamente), así como también otros RNA regulatorios (Kung *et al.*, 2013). Dentro de este último grupo encontramos a los sRNAs, involucrados en la regulación transcripcional y post-transcripcional de la expresión génica; así como también RNAs no codificantes largos (lncRNAs), definidos como transcriptos de más de 200 nts de longitud con un potencial codificante limitado. Los lncRNAs han sido implicados en una amplia gama de mecanismos regulatorios que afectan la expresión génica, incluida la remodelación de la cromatina, el *splicing* alternativo, la regulación de la actividad de miRNAs, el secuestro de proteínas y el control de la traducción (Kung *et al.*, 2013; Ariel *et al*, 2015). Estos lncRNAs poseen en general niveles de expresión relativamente bajos, se encuentran poco

conservados a nivel de secuencia nucleotídica entre especies y exhiben una expresión específica de tejidos y células, o bien se expresan únicamente en una condición particular, como por ejemplo en respuesta a cambios ambientales o durante ciertas etapas del desarrollo.

Los lncRNAs pueden ser clasificados en distintas categorías de acuerdo con su ubicación en el genoma relativa a otros genes (Figura 5). Los lncRNA intergénicos (lincRNAs, por *long intergenic non coding RNAs*) son unidades transcripcionales independientes, ubicados a más de 1 kilobase (kb) de distancia de otra unidad transcripcional. Estos transcritos en general sufren *splicing* y son poliadenilados de manera semejante a los mRNAs. Dentro de esta categoría se encuentra el primer lncRNA identificado en plantas hace más de 25 años, *ENOD40* (*Early Nodulin 40*) de *Medicago truncatula*, el cual desempeña una función en el desarrollo de órganos especializados en la fijación biológica de nitrógeno (Crespi *et al.*, 1994). Más recientemente se reportó que *APOLO*, un lincRNA de *A. thaliana*, participa en la activación transcripcional de un transportador de auxinas a través de la modificación de la topología de la cromatina (Ariel *et al.*, 2014). Los lncRNAs intrónicos son transcritos a partir de un intrón de un gen codificante, sin que exista superposición con ningún exón del RNA codificante. Como ejemplo, *COLDAIR*, transcripto transientemente en condiciones de estrés por frío a partir del primer intrón del represor floral *FLC* (*Flowering Locus C*), participa en la represión de la transcripción de *FLC* durante la vernalización de *A. thaliana* (Heo and Sung, 2011). Los lncRNAs antisentido (NATs, por *Natural Antisense Transcript*) se transcriben a partir de la hebra antisentido de una región codificante, en la dirección opuesta al gen codificante. Un ejemplo de este tipo de lncRNAs es *COOLAIR*, el cual participa en el control de la floración en *A. thaliana* (Hawkes *et al.*, 2016). Por último, se encuentran los lncRNAs transcritos a partir de regiones promotoras o a partir de *enhancers* transcripcionales. Estos transcritos son poco abundantes, poseen 5' *cap* y son poliadenilados.

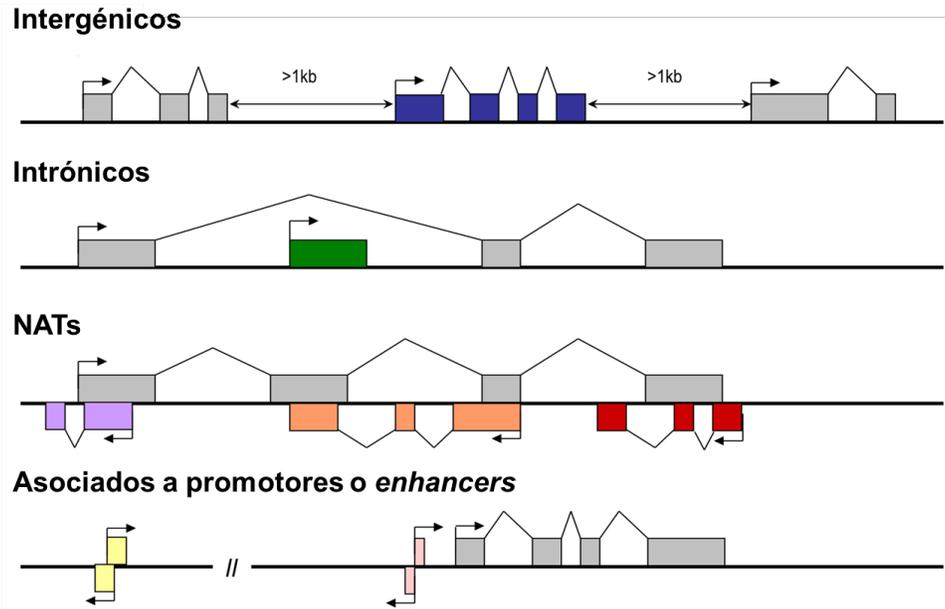


Figura 5. Clasificación y esquematización de los diferentes tipos de lncRNAs. Los lncRNAs intergénicos (lincRNAs, cuadros azules) son unidades transcripcionales independientes a más de 1 kb de otra unidad transcripcional (cuadros grises). Los lncRNAs intrónicos (rectángulo verde) son transcritos a partir de una región intrónica de un gen codificante. Los NATs (transcritos naturales anti-sentido) inician su transcripción en regiones de genes que codifican proteínas, pero en sentido opuesto al gen codificante. La superposición entre los transcritos sentido y antisentido puede ser central (cuadros naranjas) o en las regiones 5' (cuadros lilas) o 3' (cuadros rojos) de los transcritos sentido. Los lncRNAs asociados a promotores (cuadros rosas) o *enhancers* (cuadros amarillos) son transcritos a partir de regiones promotoras o de *enhancers* transcripcionales, respectivamente. Adaptado de Kung *et al.*, 2013.

La mayoría de los lncRNAs identificados en eucariotas son transcritos por la RNA polimerasa II (Kim *et al.*, 2011), y poseen *cap* en su extremo 5' y una cola de poliA en su extremo 3' (Figura 6A). Las RNA polimerasas IV y V (RNA Pol IV y V, respectivamente), específicas de plantas, también actúan en su biogénesis, generando así una población aún más compleja de lncRNAs (Vaughn and Martienssen, 2005; Zhang *et al.*, 2007). En particular, los transcritos de la RNA polimerasa IV dan lugar a la producción de siRNAs de heterocromatina, los cuales participan de la metilación *de novo* del DNA mediante un mecanismo conocido como metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM, por *RNA directed DNA methylation*) (Figura 6B). El mecanismo canónico de RdDM involucra la producción de RNAs doble cadena (dsRNAs, por *double stranded RNAs*) por acción de la RNA polimerasa RNA dependiente 2 (RDR2) sobre los lncRNAs producidos por RNA Pol IV. Estos dsRNAs son clivados por acción de la proteína Dicer-like 3 y producen siRNAs

de 24 nucleótidos, los cuales se asocian a la proteína ARGONAUTA 4 (AGO4). Los transcritos emergentes de la RNA Pol V son reconocidos por los siRNAs unidos a AGO4 por complementariedad de secuencias. AGO4 recluta a la metiltransferasa DRM2 (*DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2*), la cual produce la metilación de citosinas en diferentes contextos (Castel and Martienssen, 2013; Matzke *et al.*, 2015) (Figura 6C).

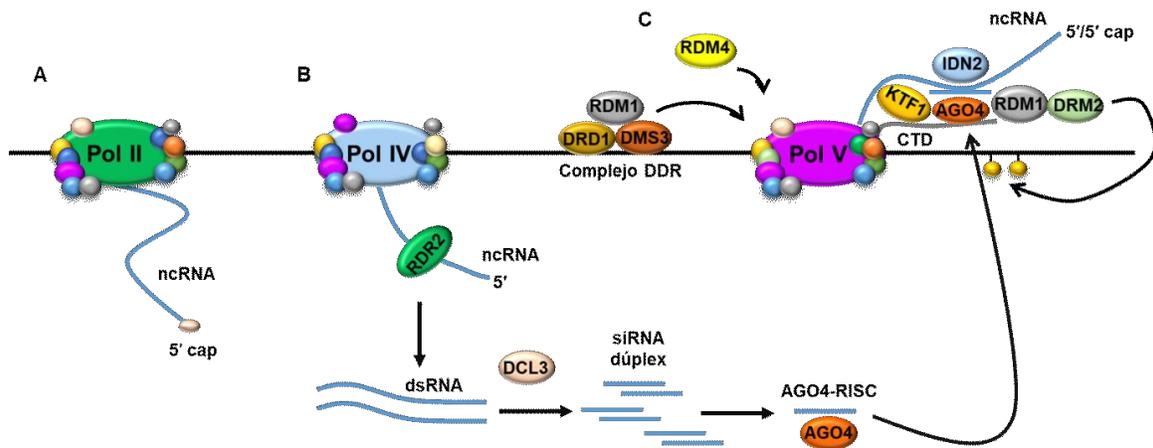


Figura 6. Síntesis de lncRNAs y metilación del DNA dirigida por RNA. A. La RNA Pol II sintetiza la gran mayoría de los lncRNAs, los cuales poseen *cap* en su extremo 5' y una cola de poliA en su extremo 3'. B. Pol IV sintetiza ssRNAs que son copiados por RDR2 generando dsRNAs largos. Los dsRNAs son procesados por DCL3 para dar siRNAs de 24 nucleótidos (nt), los cuales se asocian a las proteínas del complejo AGO4-RISC. C. El complejo DDR (formado por DRD1, DMS3 y RDM1) y RDM4/DMS4 asisten a la RNA Pol V en la síntesis de lncRNAs. AGO4 asociada a siRNAs es guiada por complementariedad de bases hacia los lncRNAs sintetizados por la RNA Pol V, que junto con RDM1, AGO4, DRM2 y otras proteínas accesorias, sirven de andamio para la formación del complejo efector que dirige la metilación *de novo* del DNA mediada por DRM2.

1.9. Regulación traduccional mediada por lncRNAs

Una de las funciones de los lncRNAs en el citoplasma es la de regular la traducción, tanto a nivel global como de mRNAs específicos. Tal es el caso de *BCI*, un lncRNA relacionado con diversos tipos de cáncer, el cual está involucrado en la proliferación celular (Booy *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2017). Este lncRNA interacciona con las PABPs, impidiendo la traducción de otros mRNAs poliadenilados (Kondrashov *et al.*, 2005), e interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4A inhibiendo la formación del complejo de

preiniciación (Wang *et al.*, 2002), afectando así globalmente la traducción. La regulación traduccional de mRNAs específicos mediada por lncRNAs ha sido descrita para el lncRNA intergénico lincRNA-p21, el cual suprime la traducción de su mRNA *target JunB* en células de carcinoma cervical (Yoon *et al.*, 2012). Otro lncRNA que actúa a este nivel es un NAT lncRNA específico de células neuronales que se transcribe a partir de la hebra antisentido del gen que codifica la proteína *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Uchl1)*, que ha sido asociada a las patologías de Parkinson y Alzheimer. Este NAT lncRNA es translocado del núcleo al citoplasma en respuesta al tratamiento con rifampicina, donde es reclutado a los polisomas y promueve específicamente la traducción de *Uchl1* (Carrieri *et al.*, 2012). Más recientemente, Tran *et al.*, (2016) reportó el NAT lncRNAs *AS-RBM15* (por *antisense RNA of RNA Binding Protein 15 involved in Megakaryocytes differentiation*), el cual estimula la traducción de *RBM15* durante la diferenciación de los megacariocitos y durante la translocación cromosómica que ocurre en la leucemia mieloide aguda.

En plantas también existen ejemplos de lncRNA que regulan la traducción. En arroz, un *cis-NAT* lncRNA incrementa la traducción del gen codificado en la hebra sentido *PHOSPHATE 1;2*, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis durante la deficiencia de fósforo (Jabnour *et al.*, 2013). Bazin *et al.* (2017) describió tres *cis-NAT* lncRNAs asociados a polisomas (ribo-*cis-NATs*), cuyo aumento se correlaciona con un incremento en la traducción de la proteína codificada en la hebra sentido en raíces de *A. thaliana* en condiciones de baja disponibilidad de fósforo. Más recientemente, Deforges *et al.*, (2019) identificó 14 *cis-NAT* lncRNAs en *A. thaliana*, cuya expresión se correlaciona con la traducción de mRNAs transcritos a partir de la hebra sentido bajo condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. Estos ejemplos respaldan la noción de que los lncRNAs pueden ser reclutados en polisomas para cumplir funciones regulatorias sobre la traducción de sus mRNA *targets*. Sin embargo, la regulación y el mecanismo de acción de la mayoría de los lncRNAs asociados a polisomas aún no se conoce en detalle.

2. Las leguminosas y su importancia ecológica y agronómica

La familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, comúnmente llamadas leguminosas, es la tercera gran familia de plantas superiores, con cerca de 20.000 especies (Gepts *et al.*, 2005), entre las que se encuentran especies de gran importancia agronómica y económica, tales como la soja, el poroto, la arveja, el maní y la alfalfa. Estas plantas son utilizadas directamente para la alimentación humana o bien como forrajeras. Como alimento, las leguminosas de grano se caracterizan por poseer un alto contenido proteico, son fuentes importantes de hidratos de carbono y una buena fuente de calcio, hierro y fósforo (Graham and Vance, 2003). Una característica sobresaliente de esta familia es que la mayoría de las leguminosas establecen una relación simbiótica con bacterias del suelo conocidas colectivamente como rizobios. Estas bacterias poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) en formas asimilables para la planta (NO₃⁻ o NH₃), reacción que se lleva a cabo dentro de órganos especializados en la raíz, denominados nódulos.

A pesar de estar inmersos en una atmósfera cuyas 4/5 partes son nitrógeno, este elemento se encuentra en concentraciones muy bajas en muchos suelos y constituye, después del agua, el principal factor limitante del desarrollo de los vegetales, ya que es constituyente de ácidos nucleicos y proteínas. El proceso de reducción de nitrógeno atmosférico a amonio consiste en una reacción metabólica que combina el nitrógeno molecular con hidrógeno para formar amoníaco. Esta reacción es llevada a cabo por el complejo enzimático de la nitrogenasa, presente en algunas bacterias, mediante la siguiente reacción:



En el contexto del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, la fijación biológica contribuye en un 60 % a la incorporación de nitrógeno a los suelos, mientras que las radiaciones ultravioletas contribuyen en un 10 % y la industria de los fertilizantes en un 25 % (Robertson and Vitousek, 2009). Estos valores muestran la importancia de la fijación biológica de nitrógeno en los ecosistemas naturales y agronómicos, y ponen en evidencia el alto potencial biotecnológico que este proceso puede tener en la agricultura. El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados tiene un impacto ambiental negativo, ya que

el amonio utilizado en las plantaciones percola en la tierra causando la contaminación de aguas superficiales y acuíferos, produciendo la eutrofización de ríos y lagos, con la consecuente destrucción de los organismos que dependen del oxígeno disuelto en el agua. Además, el aumento de nitratos en el agua utilizada para el consumo puede alcanzar niveles tóxicos, lo que representa una amenaza para la salud humana. Por otro lado, la liberación de gases nitrogenados a la atmósfera contribuye al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida (Robertson and Vitousek, 2009). La fijación biológica de nitrógeno disminuye significativamente el consumo de residuos fósiles requeridos para la síntesis de nitrato o amonio y, consecuentemente, reduce no sólo el gasto generado por la producción de fertilizantes sintetizados químicamente, sino también los efectos ambientales negativos que conlleva su abuso. La simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno se ve favorecida cuando las plantas crecen en ausencia de fertilizantes nitrogenados. Esta capacidad permite a las leguminosas propagarse bien en suelos pobres en nutrientes, reduciendo la contaminación y el daño ambiental causado por el uso de fertilizantes químicos (Graham and Vance, 2003). Es por esto que las prácticas agrícolas que incorporan el cultivo rotativo de leguminosas contribuyen al mejoramiento de la calidad del suelo.

Se proyecta que la población mundial crecerá al menos 35 % en los próximos 50 años, hasta alcanzar aproximadamente los 11.000 millones de personas en el año 2070. Se calcula entonces que se requerirá un aumento en la producción de alimentos para abastecer a esta población. Estos hechos plantean la necesidad de incrementar la producción de alimento que, en principio, podría lograrse aumentando la superficie de tierra cultivada. Sin embargo, la potencial tierra arable está severamente limitada en el mundo debido a la escasez de agua, la desertificación y la erosión de los suelos. Así es que, actualmente, la biotecnología vegetal tiene un desafío importante en el desarrollo de cultivos con mayor rendimiento y/o resistentes a condiciones climáticas severas para obtener una mayor producción de alimentos en las tierras de cultivo ya existentes. Considerando la importancia del metabolismo del nitrógeno y las serias restricciones que produce su deficiencia en el crecimiento de las plantas, el mejoramiento de la interacción entre leguminosas y rizobios por técnicas de ingeniería genética podría llevar a lograr una mayor

eficiencia de la simbiosis, promoviendo un mejor desarrollo de la planta y un mayor rendimiento de los cultivos.

3. *Medicago truncatula* como leguminosa modelo

La leguminosa *M. truncatula*, ha sido seleccionada como especie modelo de leguminosas de climas templados, como la arveja y la alfalfa. Sus semillas y plántulas son pequeñas, tiene alta producción de semillas y un ciclo de vida corto (3-4 meses), por lo que resulta fácil su manipulación en el laboratorio y a su vez, puede reproducirse por autofertilización o por cruzamientos. Además, posee un genoma diploide pequeño (550 Mbp), el cual se encuentra secuenciado (Young *et al.*, 2011; Precix *et al.*, 2018), y se han generado diversas herramientas genéticas para el estudio de las bases moleculares implicadas en el proceso de simbiosis. Asimismo, se han obtenido datos de expresión a gran escala de los principales órganos y en diversas condiciones ambientales mediante microarreglos de cDNA y de Affymetrix (Benedito *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009). Desde su selección como sistema modelo se han desarrollado herramientas que han permitido un avance significativo en el estudio de la interacción rizobio-leguminosa, como la posibilidad de generar plantas transgénicas mediante transformación estable con *Agrobacterium tumefaciens* (Trieu and Harrison 1996; Chabaud *et al.*, 2003; de Sousa Araújo *et al.*, 2004). A su vez, también es posible generar plantas compuestas que presenten raíces transgénicas y parte aérea *wild type* mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Por otro lado, se han desarrollado protocolos de mutagénesis generalizada por tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS) o rayos γ (Benaben *et al.*, 1995; Sagan *et al.*, 1995). El *screening* de poblaciones de mutantes ha permitido avanzar en la identificación de genes involucrados en distintos procesos fisiológicos (Penmetsa and Cook 2000). Las estrategias de genética directa han generado importantes avances en el estudio de las vías de señalización, permitiendo la identificación de genes requeridos para de la simbiosis (Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000). Posteriormente, el desarrollo de poblaciones mutantes por inserción con el transposón *Tnt-1* permitieron la aplicación de estrategias de genética reversa al estudio de distintos procesos de desarrollo, respuesta a estímulos ambientales e interacciones con microorganismos (d'Erfurth *et al.*, 2003; Tadege

et al., 2008; Pislariu *et al.*, 2012). Por otro lado, se han generado plataformas de mutantes de un único nucleótido mediante la inducción de lesiones en el genoma con EMS y la posterior identificación de estas mutaciones utilizando la técnica conocida como TILLING (por *Target Induced Lesions in Genomes*; Le Signor *et al.*, 2009). El desarrollo de estas herramientas técnicas y genómicas han contribuido a la consolidación de *M. truncatula* como leguminosa modelo.

4. Simbiosis fijadora de Nitrógeno

4.1. Asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios

La asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios se inicia a partir de un intercambio inicial de señales químicas. En condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, la raíz de la planta exuda flavonoides e isoflavonoides. La percepción de estas moléculas induce cambios transcripcionales en las bacterias mediados por la activación del gen *nodD* (Capela *et al.*, 2006), un factor de transcripción que reconoce y se une a los promotores bacterianos de los genes *nod*, *nol* y *noe*, los cuales participan en la síntesis de una molécula señal, de naturaleza oligosacáridica, conocida como factor de nodulación (NF, por *Nod Factor*) (Perret *et al.*, 2000; Geremia *et al.*, 1994). Esta comunicación molecular es altamente selectiva, ya que implica el reconocimiento mutuo entre ambos simbioses y determina que especie de rizobio es capaz de asociarse simbióticamente con cada especie de leguminosa (Oldroyd and Downie, 2008). La especificidad determinada por este proceso evidencia la coevolución que ha llevado al desarrollo de complejos mecanismos moleculares que intervienen en la interacción entre un organismo eucarionte y uno procarionte para establecer una nodulación eficiente. El reconocimiento se mantiene desde el inicio de la interacción y durante todo el proceso de simbiosis hasta alcanzar el estadio de nódulo maduro (Oldroyd *et al.*, 2005; Oldroyd and Downie, 2008). A pesar de ser producidos por las bacterias, los NFs se comportan en muchos aspectos como hormonas vegetales: son señales capaces de difundir y activar diversos procesos del desarrollo en la planta (Relic *et al.*, 1994; Geurts *et al.*, 2005). Los NFs actúan predominantemente en dos tipos celulares de la raíz, células epidérmicas y células corticales, provocando cambios fisiológicos,

morfológicos y moleculares que llevan, finalmente, a la formación del nódulo. Como consecuencia de esta interacción, la planta obtiene nitrógeno biológicamente asimilable, y la bacteria se beneficia de los nutrientes producto de la fotosíntesis y el nicho adecuado para la fijación de nitrógeno provistos por la planta (Oldroyd and Downie, 2008).

4.2. Proceso de infección y organogénesis del nódulo

El establecimiento de la simbiosis y la formación del nódulo son procesos complejos que se dan en etapas sucesivas y coordinadas. Luego del intercambio de señales químicas, la adhesión del rizobio a las células de los pelos radicales es el paso inicial en la asociación de la bacteria con la planta hospedante (Figura 7). La primera respuesta al intercambio de señales y a la unión a la bacteria ocurre en las células de la epidermis de la raíz. Allí, el NF sintetizado por la bacteria desencadena la despolarización de la membrana plasmática, oscilaciones en la concentración del calcio citosólico (conocido como *calcium spiking*), la inducción de la expresión de genes de nodulación tempranos y una distorsión en el crecimiento polar de los pelos radicales (Ehrhardt *et al.*, 1992; Ehrhardt *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 2000; Journet *et al.*, 2001). El cambio en la dirección del crecimiento polar de los pelos radicales lleva a que formen un rulo, encerrando a la bacteria adherida en su interior. Se degrada entonces la pared celular vegetal, se produce la invaginación de la membrana plasmática y comienza la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección (IT por *infection thread*). La bacteria penetra el tejido radical a través de este hilo hasta alcanzar las células corticales de la raíz, donde el IT se ramifica (Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd *et al.*, 2011) Al mismo tiempo que el IT avanza, ocurre la activación de la división de las células corticales en respuesta al NF, que llevan a la formación del primordio del nódulo. Cuando el IT alcanza las células del primordio, las bacterias son liberadas al interior de la célula (Roth and Stacey, 1989). Dentro del nódulo, las bacterias forman estructuras similares a organelas llamadas simbiosomas (Roth and Jeon, 1988), en el que las bacterias diferenciadas (bacteroides) quedan rodeadas por una membrana vegetal que deriva del IT (Figura 7). Estas estructuras intracelulares son las responsables de la fijación de nitrógeno.

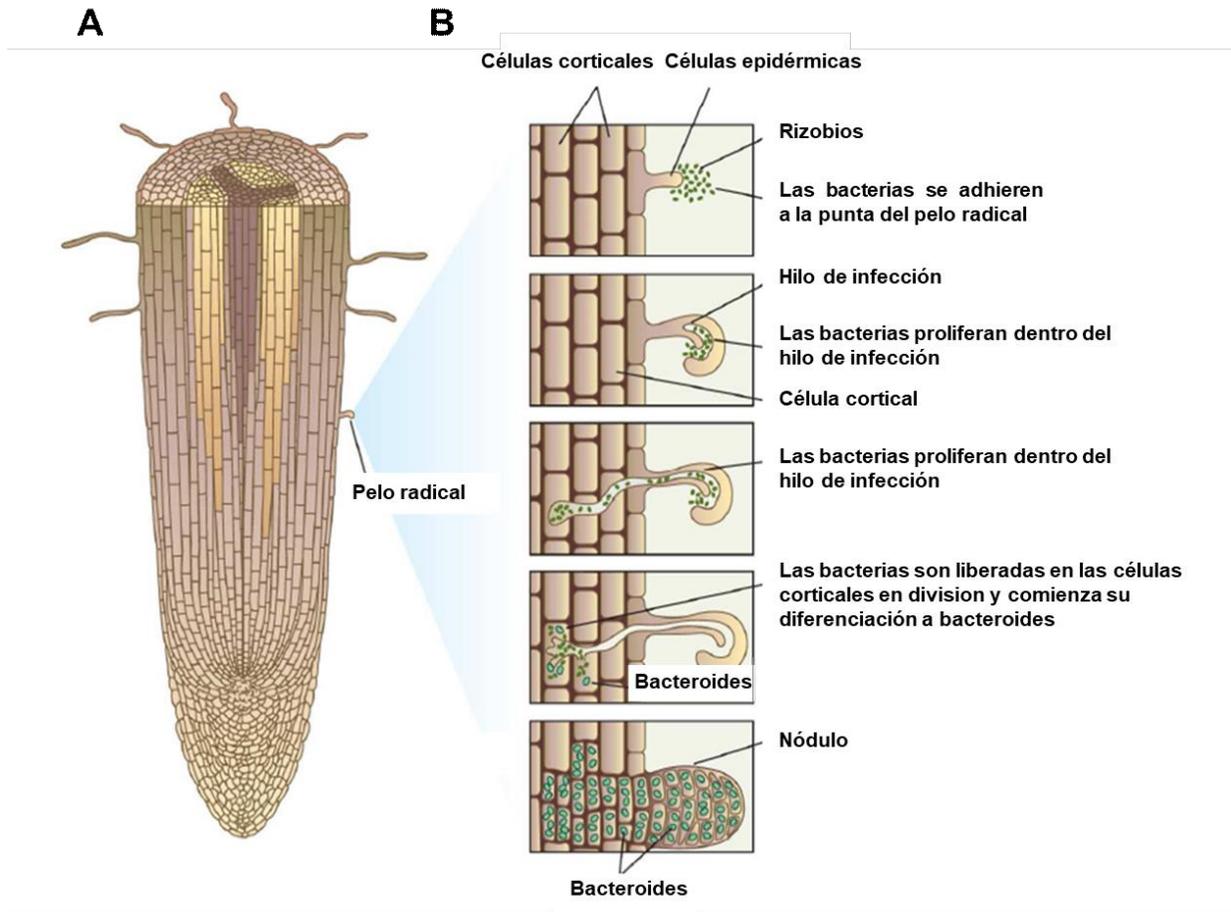


Figura 7. Esquema de las etapas iniciales de la infección rizobiana en *M. truncatula*. **A.** Esquema de la raíz de *M. truncatula*. **B.** Esquema de la infección rizobiana. De arriba abajo: la bacteria se adhiere al pelo radical provocando la formación de un rulo que engloba a la microcolonia. Se degrada la pared celular vegetal y comienza la formación del IT, que progresa hacia el interior de la raíz. El rizobio se divide monoclonalmente dentro del IT. Al mismo tiempo, comienzan las primeras divisiones celulares del periciclo, endodermis y las capas más internas del córtex para formar el primordio nodular. El IT progresa y se ramifica hacia las células del córtex en división, en las cuales se van a liberar los rizobios que infectarán el primordio del nódulo. Las bacterias quedan contenidas dentro de las células del nódulo en estructuras intracelulares responsables de la fijación de nitrógeno denominadas simbiosomas. Adaptado de Barton *et al.*, 2007.

Las leguminosas de climas templados, como es el caso de *M. truncatula*, *M. sativa* y *P. sativum*, desarrollan nódulos de tipo indeterminado. Estos nódulos se caracterizan por la presencia de un meristema apical persistente responsable de su crecimiento, dando lugar a un órgano de forma cilíndrica. A su vez, estos nódulos presentan zonas claramente diferenciadas: la zona I o meristemática contiene células indiferenciadas; la zona IIp o de infección, donde las bacterias son liberadas; la zona intermedia IIId, donde los rizobios

comienzan a diferenciar a bacteroides, la zona II o intermedia y la zona III o de fijación de N_2 , cuyas células contienen simbiosomas maduros con bacteroides completamente diferenciados que producen la fijación de nitrógeno. Luego de varias semanas, los nódulos desarrollan una zona IV o de senescencia, en donde la fijación de nitrógeno cesa y las células vegetales y bacterianas degeneran (Figura 8). En los nódulos indeterminados, el primordio nodular se desarrolla a partir de divisiones celulares del periciclo, la endodermis y del córtex interno (Gibson *et al.*, 2008). Las divisiones celulares del periciclo y la endodermis forman los haces vasculares y los tejidos periféricos no infectados del nódulo (Xiao *et al.*, 2014). Los procesos fisiológicos y moleculares que ocurren en el córtex durante la nodulación son diferentes de aquellos que ocurren en la epidermis. Sin embargo, para que se produzca un nódulo funcional, los procesos corticales y epidérmicos deben ser coordinados, de tal manera que el primordio de nódulo se forme cerca del sitio de infección bacteriana (Oldroyd and Downie, 2008).

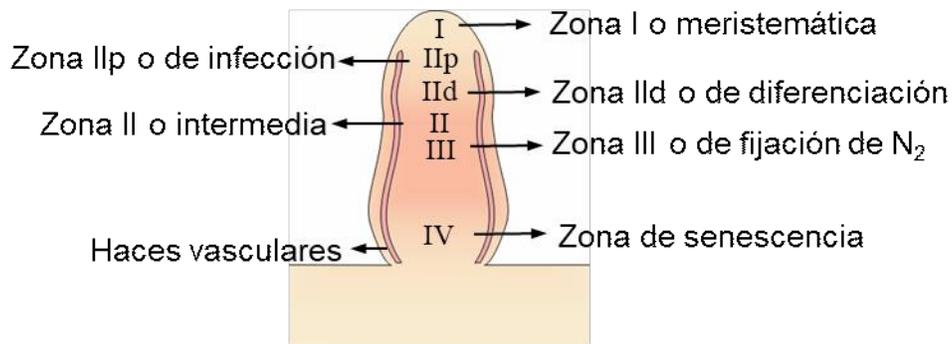


Figura 8. Nódulos desarrollados en las raíces de *M. truncatula*. Esquema ilustrativo de la morfología de un nódulo indeterminado maduro. **I**: Zona I o meristemática. **IIp**: Zona IIp o de infección. **IIId**: Zona IIId o de inicio de la diferenciación. **II**: Zona II o intermedia. **III**: Zona III o de fijación de N_2 . **IV**: zona de senescencia.

4.3. Bases moleculares de la nodulación

Como se mencionó anteriormente, el proceso de infección comienza con la percepción del NF por receptores presentes en la membrana plasmática de las células epidérmicas vegetales. La percepción de los NFs involucra receptores de membrana de tipo Serina/Treonina quinasa con dominios extracelulares LysM (*lysin motif*), los cuales fueron

denominados NFP (*Nod Factor Perception*) y LYK3 (*LYsM receptor like Kinase 3*). Mutantes de pérdida de función en estos genes tienen fenotipos no nodulantes y carecen de las respuestas tempranas de la simbiosis tales como la deformación de los pelos radicales y la formación de ITs (Arrighi *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007). Los dominios extracelulares LysM son los responsables de reconocer y unir el NF (oligosacáridos con residuos de N-acetil-glucosamina) (Mulder *et al.*, 2006), mientras que los dominios intracelulares de tipo quinasa son los responsables de iniciar la transducción de señales mediante la fosforilación de proteínas. La percepción del NF por los receptores NFP y LYK3 en células epidérmicas de la raíz desencadena oscilaciones en la concentración de calcio, tanto dentro del núcleo como en el citoplasma que lo rodea (Ehrhardt *et al.*, 1996). Estudios genéticos han revelado varios componentes necesarios para que tengan lugar las oscilaciones de calcio desencadenadas por el NF. Estos incluyen al receptor tipo quinasa DMI2 (*Doesn't Make Infections 2*) (Endre *et al.*, 2002), el cual posee un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina. Los mutantes de *DMI2* son incapaces de nodular y formar ITs, mientras que su sobreexpresión resulta en la formación espontánea de nódulos (Ried *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2014). Otro gen requerido para la infección es *DMI1*, el cual codifica para un canal catiónico localizado en la membrana nuclear (Ané *et al.*, 2004). Este canal, junto con las nucleoporinas NUP85, NUP133 y NENA (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010), las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) (Charron and Sibley, 2004), una bomba de calcio impulsada por ATP (Engstrom *et al.*, 2002) y los canales activados por nucleótidos cíclicos denominados CNGC15 *a, b* y *c* (*Cyclic Nucleotide-Gated Channel 15*), son requeridos para la liberación de calcio hacia el nucleoplasma que se produce en respuesta al FN (Ehrhardt *et al.*, 1996; Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010). Esta respuesta es conocida como *calcium spiking*. Se ha propuesto la participación de *DMI1* en la despolarización de la membrana, provocando la apertura de canales de calcio operados por voltaje que regulan el flujo de calcio asociado al núcleo (Peiter *et al.*, 2007; Charpentier *et al.*, 2016). Considerando estas evidencias, se cree que la percepción del NF genera una cascada de fosforilaciones que desencadena la producción de mensajeros secundarios, los cuales vincularían la percepción del NF en la membrana plasmática con los cambios en la concentración de calcio en las cercanías del núcleo (Oldroyd and Downie, 2008). La percepción de los picos de calcio y la transducción de

esta señal dentro del núcleo estarían a cargo de DMI3, una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (Mitra *et al.*, 2004). Los mutantes DMI3 presentan oscilaciones de calcio en respuesta al FN, pero no forman hilos de infección (Lévy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004). Una mutación de ganancia de función que produce una forma constitutivamente activa de esta proteína inicia una serie de respuestas moleculares que llevan a la formación de nódulos en ausencia de rizobio (Tirichine *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2010). DMI3 se asocia y fosforila al factor de transcripción IPD3 (*Interacting Protein of DMI3*), iniciando una activación jerárquica de factores de transcripción que desencadenan los cambios transcripcionales requeridos para la simbiosis (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008; Horváth *et al.*, 2011; Ovchinnikova *et al.*, 2011). Las oscilaciones de calcio resultan en la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes tempranos de nodulación (ENOD, por *Early nodulation*). El primer factor de transcripción caracterizado genéticamente fue NIN (*Nodule Inception*), el cual es requerido para la formación de hilos de infección y el inicio de las divisiones celulares en el córtex que dan lugar a la formación del primordio nodular (Schauser *et al.*, 1999). Posteriormente, se identificaron dos factores de transcripción de la familia GRAS, denominados NSP1 (*Nodulation Signalling Pathway 1*) y NSP2, requeridos para la formación del foco de infección y el desarrollo del primordio del nódulo (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005). NSP1 y NSP2 forman un heterodímero que se asocia y activa al gen de nodulación temprano *ENOD11* (*Early nodulation 11*) y a los genes que codifican los factores de transcripción NIN y ERN1 (*Ethylene Response Factor Required for Nodulation 1*) (Hirsch *et al.*, 2009). Los mutantes en *ERN1* fallan en iniciar la formación de hilos de infección luego de la inoculación con rizobio (Middleton *et al.*, 2007). De manera secuencial, NIN induce la expresión de *NF-YA1* y *NF-YB1*, dos de las subunidades de los factores de transcripción triméricos NF-Y (*Nuclear factor Y*) (Soyano *et al.*, 2013). Los NF-Ys son esenciales tanto para la formación y la progresión de hilos de infección, como también para las etapas posteriores del desarrollo del nódulo, y promueven la reactivación del ciclo celular reiniciando las divisiones mitóticas de las células del córtex requeridas para la organogénesis del nódulo (Combiere *et al.*, 2006; Zanetti *et al.*, 2010; Laloum *et al.*, 2013; Baudin *et al.*, 2015). Se ha descrito a *ENOD12* como otro gen ENOD inducido por la infección rizobiana que codifica una proteína con repeticiones ricas en prolina (Journet *et al.*, 1994). *ENOD12*, al igual que *ENOD11*, se

asociaría a la pared celular para permitir las modificaciones de su estructura durante la infección y la organogénesis (Crespi and Galvez, 2000). Por otro lado, el gen *ENOD40* ha sido involucrado en la organogénesis del nódulo (Crespi *et al.*, 1994). Las plantas con niveles aumentados o disminuidos de *ENOD40* muestran una nodulación aumentada o disminuida, respectivamente (Charon *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2007). A su vez, la organogénesis del nódulo es dirigida por la acción de fitohormonas, principalmente citoquininas y auxinas. En el córtex, las citoquininas son percibidas principalmente por el receptor CRE1 (*Cytokinin Receptor 1*), el cual interviene en la organogénesis de nódulo y en la infección rizobiana de manera antagónica. Por otro lado, en *M. truncatula*, el silenciamiento de *CRE1* no impide la formación de los ITs, pero sí bloquea su progresión y el desarrollo de nódulos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). CRE1 activa un grupo de proteínas en respuesta a citoquininas denominadas RR (*Response Regulators*), entre las cuales se encuentra RR1, cuyos niveles de expresión aumentan en nódulos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). RR1 regula a sus *targets* *NSP2*, *RR4* y *bHLH* (*basic Helix-loop-Helix*) (Ariel *et al.*, 2012). Otro de los efectos de la vía de señalización mediada por CRE1 es el cambio del transporte polar de auxinas, el cual es suprimido por la infección del rizobio y el tratamiento con NF (Plet *et al.*, 2011). Además, RR4 es regulado por el factor de transcripción de la familia AP2/ERF, EFD, el cual es requerido para la diferenciación de los bacteriodes y la organogénesis del nódulo (Vernié *et al.*, 2008).

5. Aplicación de la técnica de TRAP para el estudio de la regulación traduccional durante la simbiosis

Como se mencionó anteriormente, el programa genético simbiótico requiere la activación jerárquica de un conjunto de factores de transcripción que orquestan la reprogramación génica en las diferentes capas celulares involucradas en la infección bacteriana y la organogénesis de los nódulos (Oldroyd *et al.*, 2013). La reprogramación transcripcional se ha caracterizado en diferentes etapas de la simbiosis entre *M. truncatula* y su par simbiote *Sinorhizobium meliloti* en órganos completos (El Yahyaoui *et al.*, 2004; Lohar *et al.*, 2006; Benedito *et al.*, 2008; Maunoury *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2011), capas celulares específicas de la raíz (Breakspear *et al.*, 2014; Jardinaud *et al.*, 2016) y zonas específicas

de nódulos (Limpens *et al.*, 2013; Roux *et al.*, 2014). Sin embargo, se sabe poco sobre cómo el control traduccional y la estabilidad de los mRNAs contribuyen a la reprogramación de las células de la raíz para la simbiosis.

Para comprender las bases moleculares de la traducción selectiva y su contribución relativa a la reprogramación de las células de la raíz para la simbiosis, se puso a punto en nuestro laboratorio la técnica de TRAP mencionada anteriormente en plantas de *M. truncatula* (Reynoso *et al.*, 2013). Esta técnica permitió cuantificar cambios en el traductoma en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* en muestras de tejido de raíz total para 15 mRNAs que participan en la vía de señalización del NF (Reynoso *et al.*, 2013). Si bien la traducción no se ve afectada globalmente por la infección rizobiana dado que no se observan cambios significativos en los perfiles de polisomas (Figura 9A), la aplicación de la técnica de TRAP permitió demostrar que ciertos mRNAs específicos, tales como *NSP1*, *NSP2*, *CRE*, *NFP*, *NF-YA1* y *NF-YC1* son reclutados selectivamente a los polisomas (Figura 9B) (Reynoso *et al.*, 2013). Estos resultados evidenciaron que existe una regulación selectiva a nivel de la traducción de los mRNAs y que aquellos genes que cumplen funciones claves en el desarrollo de la interacción simbiótica sufren cambios significativos a nivel traduccional en respuesta a la infección rizobiana.

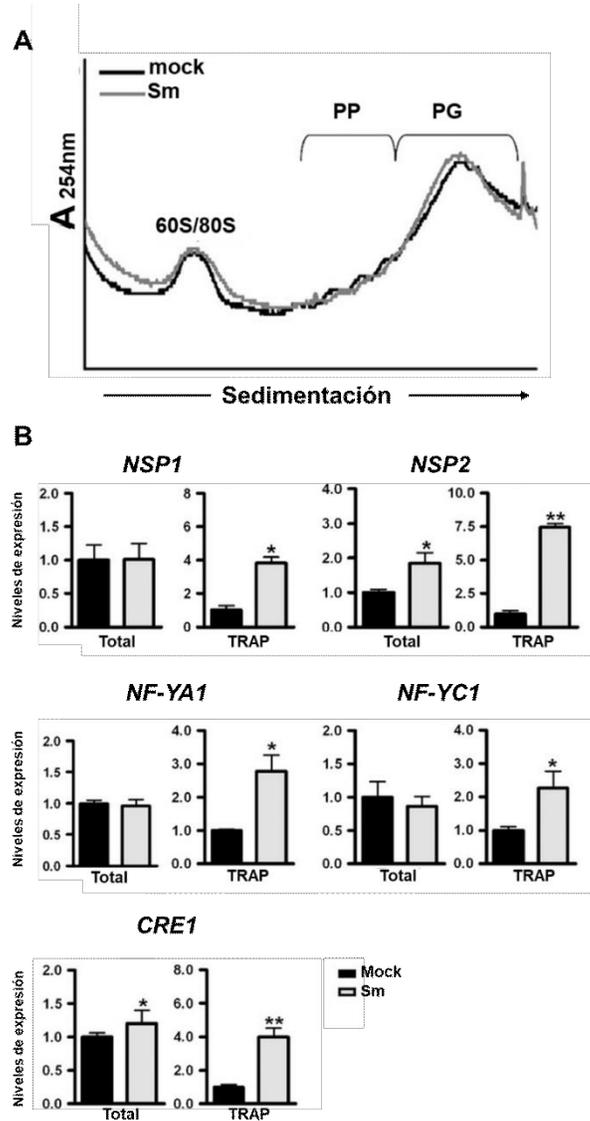


Figura 9. Efecto de la inoculación con *S. meliloti* sobre el perfil de polisomas y la asociación a polisomas de transcritos de la vía de respuesta a NF. **A.** Extractos totales de raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*) fueron fraccionados por ultracentrifugación diferencial en gradientes de densidad de sacarosa 20-60% (p/v). Para cada una de las fracciones se registró el perfil de absorbancia a 254 nm (A254). Se indican las posiciones de la subunidad ribosomal 60S, monosomas (80S), polisomas pequeños (PP, entre 2 y 5 ribosomas por transcritos) y polisomas grandes (PG, más de 5 ribosomas por transcritos). **B.** Asociación selectiva de transcritos a polisomas en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Abundancia relativa de transcritos medida por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa. Se muestran los resultados correspondientes a cinco transcritos seleccionados que forman parte de la respuesta a NF en muestras de RNA total y RNA TRAP inoculadas con *S. meliloti* (Sm, barras grises) o agua (*mock*, barras negras) obtenidas de raíces que expresan la proteína FLAG-RPL18. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcritos *HIS3L* y están expresados relativos a la condición control. Los asteriscos indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras *mock* en un test t-Student no apareado de dos colas con $0,01 < P < 0,05$ (*) y $0,001 < P < 0,01$ (**), (Reynoso *et. al.*, 2013).

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis y objetivo general

Uno de los objetivos principales de la biotecnología vegetal moderna es optimizar la producción de los cultivos de importancia agronómica de manera sustentable. La disponibilidad de nitrógeno en el suelo afecta el rendimiento de los cultivos e impacta directamente en el contenido proteico de las semillas. En los sistemas agrícolas, el nitrógeno es provisto en forma de fertilizantes químicos, cuyo uso masivo tuvo un fuerte impacto positivo sobre la productividad agrícola. Sin embargo, la utilización excesiva de fertilizantes ha impactado negativamente en el medio ambiente. Esto plantea la necesidad de desarrollar y aplicar estrategias alternativas y sustentables para utilizar al máximo los recursos agronómicos disponibles sin afectar el medio ambiente. La fijación biológica de nitrógeno, producto de la simbiosis entre rizobios y leguminosas, permite la incorporación de nitrógeno al suelo para su explotación en sistemas agropecuarios a muy bajo costo, y por lo tanto constituye una excelente opción para mantener la calidad de los suelos en países donde la explotación agrícola del suelo es extensiva.

Si bien en los últimos años se ha avanzado en la identificación de genes de la planta requeridos para una nodulación eficiente, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos moleculares que regulan un proceso complejo, en el que se integran y coordinan la infección de la bacteria, el desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa y las señales del ambiente. El auge de las técnicas asociadas a la transcriptómica ha llevado a que se usen los niveles estacionarios de mRNA como criterio para la selección y el estudio de genes con una posible implicancia en caracteres de importancia agronómica. Este enfoque ha excluido los niveles de regulación post-transcripcional, asociados a una respuesta rápida mediante la activación o la represión de mRNAs preexistentes. Estos mecanismos que operan durante la formación del nódulo contribuyen a la regulación de la expresión de genes requeridos para la simbiosis. El estudio de estos mecanismos es esencial para establecer criterios racionales que permitan optimizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

La **hipótesis principal** del presente trabajo es que la regulación a nivel de la traducción y decaimiento de los transcritos contribuye a modular la expresión génica durante la reprogramación de las células de la raíz para la endosimbiosis fijadora de nitrógeno.

Para poner a prueba esta hipótesis, el **objetivo general** planteado en el presente trabajo fue caracterizar a escala genómica la distribución dinámica de las poblaciones de mRNAs y lncRNAs asociados a la maquinaria traduccional durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Posteriormente, nos propusimos caracterizar mediante genética funcional transcritos regulados específicamente a este nivel en respuesta a la infección rizobiana, a fin de dilucidar sus funciones biológicas y evaluar su importancia en distintas etapas de la asociación simbiótica entre la planta y el rizobio. Para abordar el objetivo general planteado se utilizó la leguminosa *Medicago truncatula*, la cual se ha establecido como modelo para el estudio de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

2. Objetivos específicos

En base al objetivo general y la hipótesis planteada se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterizar las poblaciones de transcritos asociadas a la maquinaria traduccional y su modulación en respuesta al rizobio mediante el análisis de bibliotecas de RNA-seq y TRAP-seq.
- 2- Explorar la función de *SUPERKILLER3 (SKI3)* durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.
 - a. Caracterizar funcionalmente a *SKI3* durante el desarrollo de nódulos mediante el análisis del fenotipo asociado a la nodulación en raíces de *M. truncatula*.
 - b. Evaluar la participación de *SKI3* en los mecanismos que regulan el decaimiento de mRNAs.
- 3- Caracterizar las funciones que desempeñan los lncRNAs asociados a la maquinaria traduccional en la organogénesis del nódulo y/o en el proceso de infección rizobiana.

- a. Identificar lncRNAs que cambian su asociación a la maquinaria traduccional en etapas tempranas de la asociación simbiótica.
- b. Caracterizar funcionalmente el lncRNA intergénico *POSEIDON* durante el desarrollo de nódulos en raíces de *M. truncatula*.

Capítulo 1

Análisis de la regulación traduccional en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

1. Diseño experimental para caracterizar los cambios en el transcriptoma y traductoma durante la simbiosis

Con el objetivo de caracterizar a escala masiva u “ómica” el efecto de la infección rizobiana en la expresión génica en la raíz, se evaluaron los cambios tanto a nivel transcripcional (niveles estacionarios de transcritos) como traduccional en etapas tempranas de la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti* mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq). Se obtuvieron muestras de RNA Total y RNA asociado a la maquinaria traduccional aislado mediante la metodología TRAP (de aquí en adelante RNA TRAP) de raíces de *M. truncatula* inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* (Sm) correspondientes a dos réplicas biológicas colectadas a las 48 horas post-inoculación (hpi). Como fue previamente mencionado en la introducción, a este tiempo ya se pueden observar cambios morfológicos en las raíces de la planta en respuesta al rizobio, tales como el enrollado de los pelos radicales y las divisiones celulares corticales que darán lugar al primordio del nódulo (Lohar *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2014; Larrainzar *et al.*, 2015) (Figura 10).

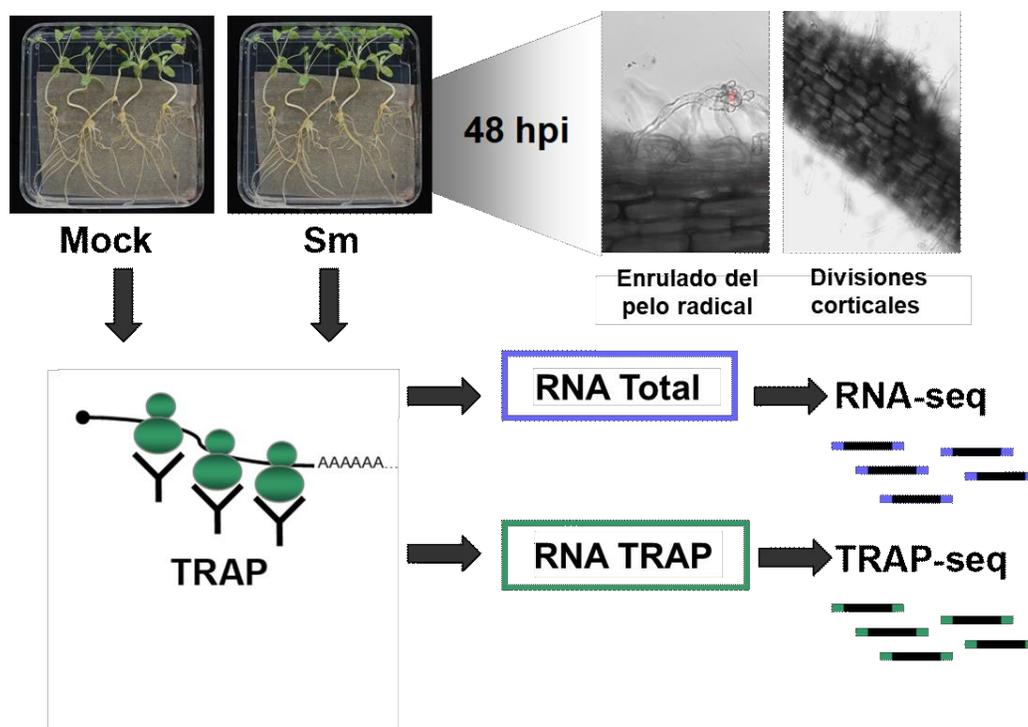


Figura 10. Esquema general del diseño experimental utilizado para caracterizar los cambios a nivel transcripcional y traduccional. Las raíces de *M. truncatula* fueron inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*). Al cabo de 48 horas post-inoculación (hpi) se colectó el tejido de las raíces completas y se prepararon extractos totales utilizando para esto un *buffer* que mantiene la integridad de los polisomas. A partir de una alícuota de los mismos se realizó una extracción de RNA total seguido de RNA-seq. El resto de los extractos totales se utilizaron para purificar los RNAs asociados a la maquinaria traduccional mediante la técnica de TRAP, los cuales fueron sometidos a RNA-seq (TRAP-seq).

Las muestras de RNA Total y RNA TRAP se utilizaron para la construcción de bibliotecas para secuenciación masiva utilizando la metodología desarrollada por la empresa Illumina. Se obtuvieron un total de ocho bibliotecas resultantes de la combinación de dos condiciones (*mock* y Sm), dos poblaciones de RNA (Total o TRAP) y dos réplicas biológicas. La secuenciación produjo entre 61 y 57 millones de pares de lecturas de 100 pb por biblioteca para las muestras Total y TRAP, respectivamente. Dichas lecturas fueron alineadas al genoma de referencia de *M. truncatula*, versión 4.0 (Mtv4.0, Young *et al.* 2011) utilizando el programa TopHat2 (Kim *et al.* 2013), arrojando un porcentaje de alineamiento promedio cercano al 90 % para seis de las bibliotecas, siendo mayor al 80% para las dos restantes (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la secuenciación masiva de bibliotecas de RNA total y RNA TRAP

Muestra	No. de lecturas	No. de lecturas alineadas (%)	Promedio de longitud de lecturas (pb)
Total <i>mock</i> Rep #1	85578290	80148813 (93.3%)	100
Total <i>mock</i> Rep #2	46365630	37188663 (80.2%)	101
Total Sm Rep #1	71569736	66843904 (93.4%)	100
Total Sm Rep #2	42000504	38988734 (92.8%)	101
TRAP <i>mock</i> Rep #1	72405126	66465623 (91.8%)	100
TRAP <i>mock</i> Rep #2	42234292	38988734 (92.3%)	101
TRAP Sm Rep #1	77669944	71543211 (92.1%)	100
TRAP Sm Rep #2	38198292	32042020 (83.8%)	101

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó utilizando el protocolo *Tuxedo* (Trapnel *et al.*, 2012) a través de la plataforma *Galaxy*. Las abundancias relativas expresadas en fragmentos por kilobase por millón de lecturas (FPKM) alineadas al genoma de referencia para todos los genes y las variantes de transcripto se cuantificaron utilizando los programas TopHat2 (Kim *et al.* 2013) y Cufflinks (Trapnel *et al.*, 2012) (Tablas Suplementarias 1 y 2). La comparación de los valores de FPKM entre las distintas muestras indicó una alta reproducibilidad ($r > 0,9988$) entre las réplicas biológicas tanto en las muestras RNA Total como en las de RNA TRAP (Figura 11). La media de FPKM de ambas réplicas se calculó para todos los genes, considerando solamente los genes con un valor medio de FPKM $\geq 0,5$ en al menos una muestra. El número de genes expresados en las raíces de *M. truncatula* bajo las condiciones del experimento utilizando el criterio mencionado fue de 22.171.

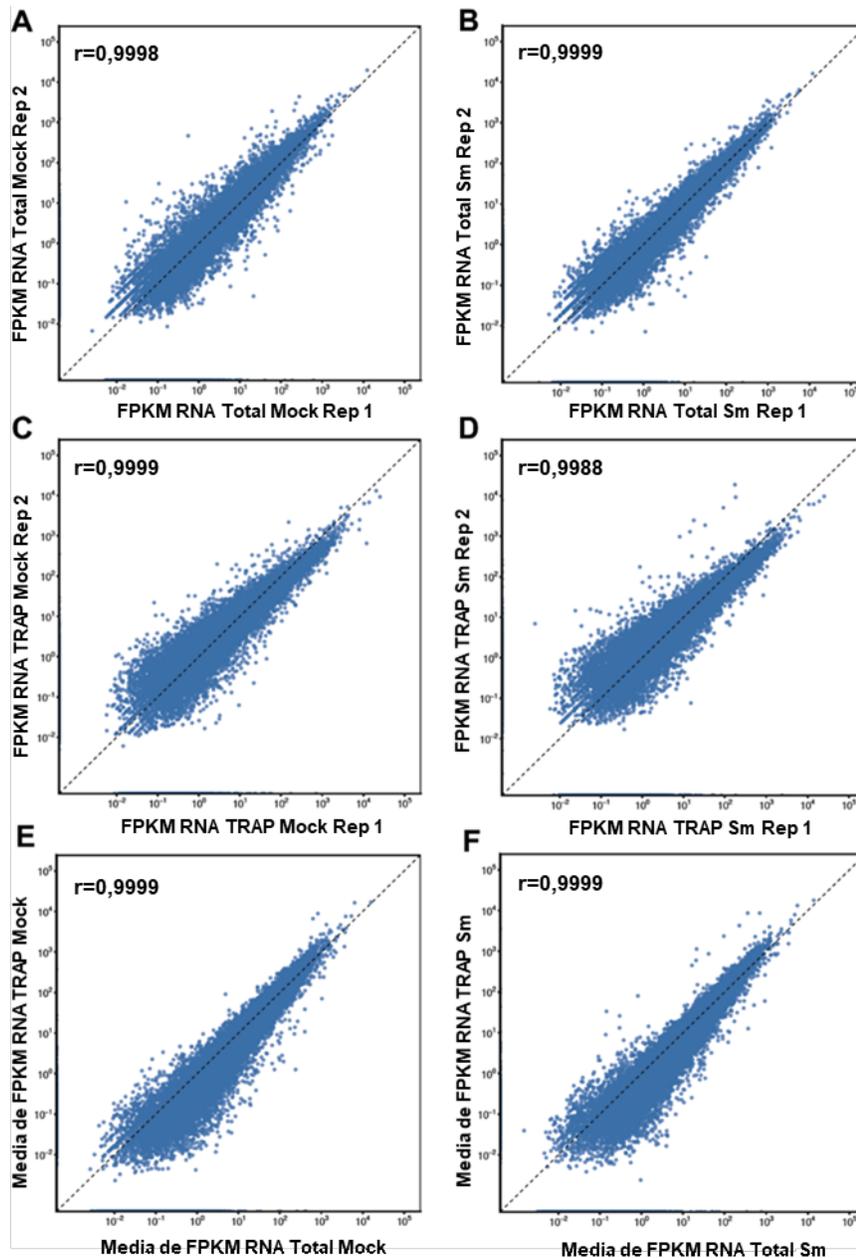


Figura 11. Reproducibilidad entre réplicas biológicas. A-D. Diagramas de dispersión de los valores de FPKM de dos réplicas biológicas independientes de Total RNA-seq (A and B) y TRAP-seq (C and D). E-F. Diagramas de dispersión de los valores medios de FPKM de dos réplicas biológicas independientes comparando RNA Total y RNA TRAP en muestras *mock* e inoculadas con *S. meliloti*. El coeficiente de correlación de Pearson (r) para cada muestra se indica en el margen superior izquierdo de cada gráfico.

2. Los cambios a nivel transcripcional y traduccional que ocurren en etapas tempranas de la asociación simbiótica exhiben una correlación limitada

Para identificar los genes regulados diferencialmente a nivel transcripcional y traduccional en respuesta a la inoculación, se realizaron comparaciones de pares de las muestras de RNA Total de raíces control (*mock*) frente a las muestras de RNA Total de raíces inoculadas con *S. meliloti* y de muestras de RNA TRAP de raíces control (*mock*) frente a las muestras de RNA TRAP de raíces inoculadas con *S. meliloti*. Se consideraron genes expresados diferencialmente (de aquí en adelante GEDs) aquellos que presentaron un cambio (*fold change*) de al menos 2 veces entre muestras y un valor de $p \leq 0,05$. De esta manera, se identificaron 116 y 186 genes regulados positiva y negativamente a nivel transcripcional en respuesta a la inoculación, respectivamente. Por otro lado, se identificaron 130 y 87 genes regulados positiva y negativamente a nivel traduccional, respectivamente (Figura 12A) (Tabla Suplementaria 3).

La comparación entre GEDs regulados a nivel transcripcional y traduccional permitió identificar 41 genes regulados positivamente tanto a nivel transcripcional como traduccional en respuesta a *S. meliloti*. Este grupo incluye genes con funciones clave en la infección rizobiana y en la formación de nódulos (Tabla Suplementaria 4); como los genes que codifican los factores de transcripción NIN, ERN1 y NF-YA1, la proteína remodeladora de pared celular Pectato liasa de nódulo (NPL por *Nodule Pectate Lyase*), Expansina B1 ligasa (ExpB1), y las ligasas de ubiquitina E3 PUB1 (*Plant U-box protein 1*), y SINA (*Seven in absentia*). Sorprendentemente, casi el 65% (75 de 116) de los GEDs regulados positivamente en el transcriptoma de la raíz no mostraron un aumento a nivel traduccional, lo que indica un desacoplamiento parcial entre las respuestas transcripcional y traduccional. Además, de los 186 genes regulados negativamente a nivel transcripcional, sólo 3 fueron regulados negativamente a nivel traduccional (Figura 12B). La falta de correlación entre los cambios a nivel transcripcional y traduccional en respuesta a *S. meliloti* se puede observar a través de un gráfico de tipo dot-plot de los cambios a nivel de RNA Total y de RNA TRAP (Figura 12C y 12D). Estos análisis revelaron que existe una superposición limitada entre los genes regulados a nivel transcripcional y traduccional, lo que apoya la idea de que la traducción selectiva de los mRNAs contribuye a regular la

expresión génica en las etapas iniciales de la interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios.

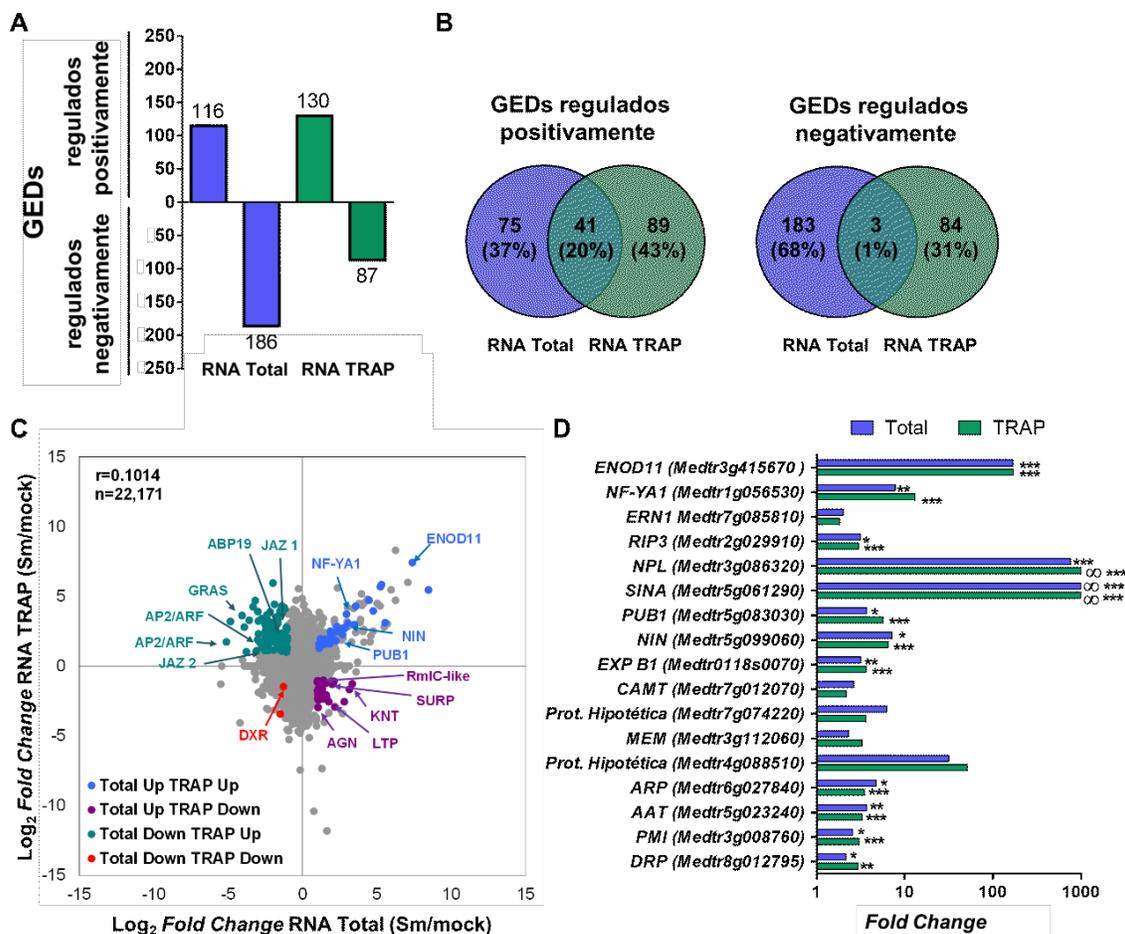


Figura 12. Cambios transcripcionales y traduccionales en raíces de *M. truncatula* en respuesta a *S. meliloti*. **A.** Número de genes regulados diferencialmente en las muestras de RNA Total y RNA TRAP (*fold change* ≥ 2 , $p < 0,05$). **B.** Diagramas de Venn ilustrando la limitada superposición entre los GEDs en muestras de RNA Total y RNA TRAP. **C.** Diagrama de dispersión donde se representa el *fold change* de cada gen en las muestras Total y TRAP en respuesta al rizobio. Comparación de las muestras de RNA total de raíces *mock* (inoculadas con agua) frente a raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm) y de las muestras de RNA TRAP de las raíces *mock* frente a raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm). Cada punto representa el \log_2 *Fold Change* (FC) en las muestras Total y TRAP. Los genes expresados diferencialmente (GEDs) se muestran como puntos de colores. Ciertos GEDs están indicados: ENOD11 (Early nodulin 11, Medtr3g415670), NF-YA1 (Nuclear factor YA1, Medtr1g056530), NIN (Nodule Inception, Medtr5g099060), PUB1 (Plant U-box protein 1, Medtr5g083030), GRAS (GRAS family transcription factor, Medtr4g122240), AP2/ERF 1 (APETALA 2/Ethylene Response Factor 1, Medtr4g086190), AP2/ERF 2 (Medtr4g086165), JAS 1 (jasmonate zimd-domain protein 1, Medtr5g013520), JAS 2 (Medtr5g013530), ABP19 (Auxin Binding Protein 19, Medtr2g019780), DXR (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Medtr8g012565), AGN (Agenet domain protein, Medtr5g089140), LTP (Lipid Transfer protein, Medtr7g094650), KTN (knotted 1-

binding protein, Medtr4g118050), Rmc-like (RmlC-like cupins superfamily protein, Medtr2g072560) y SURP (SURP and G-patch domain protein, Medtr8g036255). **D.** *Fold change* en el transcriptoma o el traductoma de los genes marcadores de nodulación. Cada valor representa el valor medio de FPKM de muestras inoculadas con *S. meliloti* sobre el valor medio de FPKM de muestras *mock* de dos réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: P <0.05, **: P <0.01, ***: P <0.001). ∞ indica que los valores de FPKM en muestras *mock* fueron 0 o cercanas a 0.

Los GEDs regulados a nivel transcripcional y traduccional se clasificaron en categorías funcionales basadas en *Gene Ontology* (GO) seguido de una inspección manual y reclasificación de los genes individuales (Figura 13A). Además de las proteínas de función desconocida, las categorías más representadas entre los genes regulados positivamente a nivel transcripcional fueron: procesos rédox, transporte, y percepción y señalización; mientras que, entre los genes regulados negativamente a nivel transcripcional, las categorías más representadas fueron metabolismo y regulación transcripcional. Por otro lado, los genes que codifican proteínas involucradas en la regulación de la transcripción también estuvieron altamente representados en la lista de genes regulados positivamente a nivel traduccional, mientras que los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo hormonal o la biosíntesis de hormonas se encontraron representados en gran medida entre los genes regulados negativamente a este nivel; tal es el caso de cinco genes que codifican *Small Auxin Up regulated (SAUR)-like proteins*, que se identificaron dentro de esta categoría (Figura 13B). *SAUR* es la familia más grande de genes de respuesta temprana a la hormona de crecimiento y desarrollo vegetal auxina y, por lo tanto, están implicados en la regulación de una amplia gama de procesos celulares, fisiológicos y de desarrollo. Se conoce además que otras hormonas y factores ambientales también regulan la expresión de los genes *SAUR*, por lo que serían efectores clave de señales hormonales y ambientales que regulan el desarrollo de las plantas, permitiéndoles así ajustar su crecimiento en respuesta a señales internas y externas (Ren and Gray, 2015; van Mourik *et al.*, 2017).

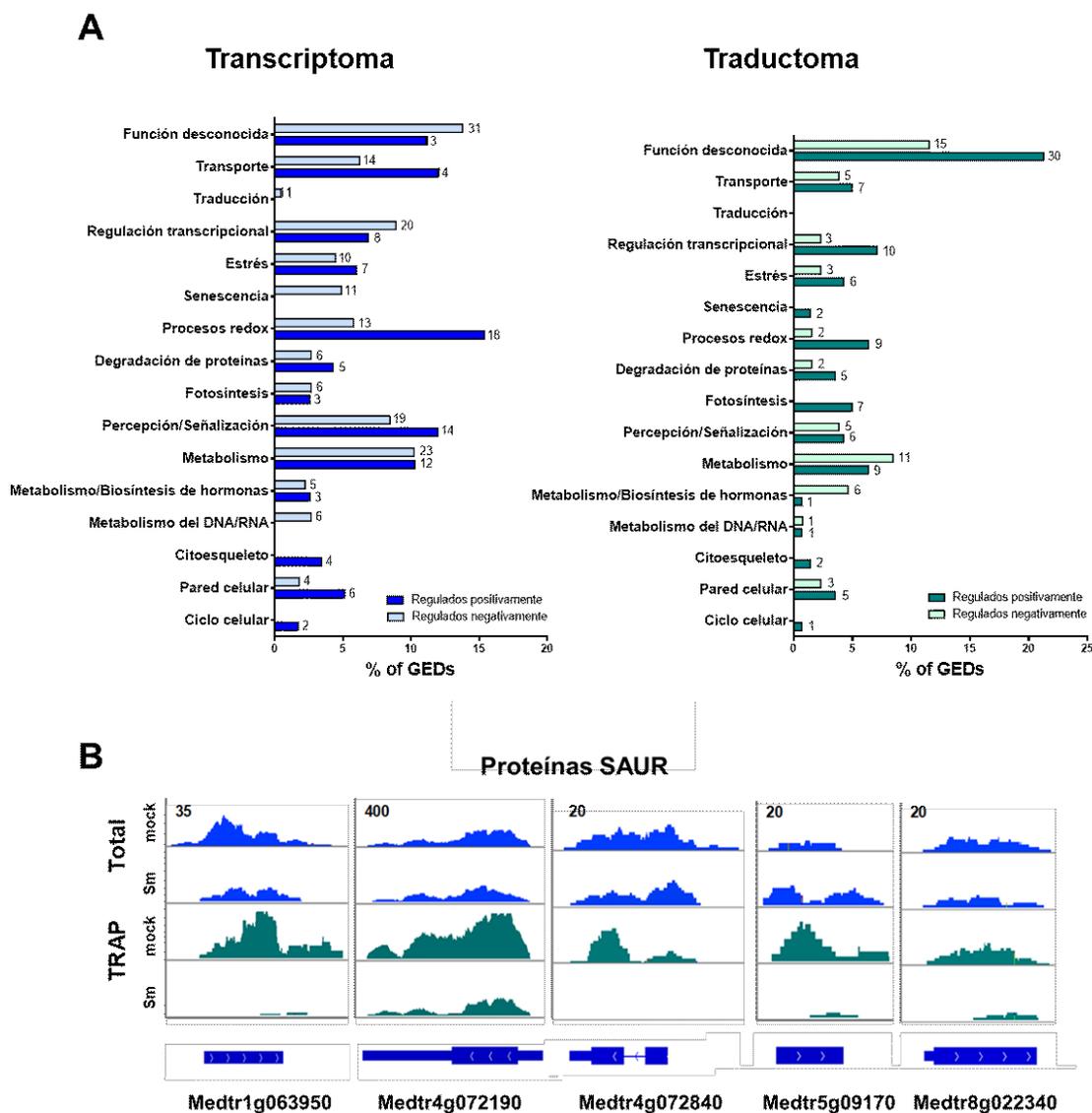


Figura 13. Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente (GEDs) en el transcriptoma y el traductoma. **A.** Los GEDs en el transcriptoma (RNA Total) o el traductoma (RNA TRAP) se clasificaron en diferentes categorías funcionales según *Gene Ontology* (GO) seguido de la inspección manual de genes individuales. Los números indican la cantidad total de genes en cada categoría. Las barras azules y verdes oscuras representan los GEDs regulados positivamente en el transcriptoma y traductoma, respectivamente, las barras celestes y verde claro representas los GEDs regulados negativamente en el transcriptoma y traductoma, respectivamente. **B.** Distribución de las lecturas de RNA-seq de cinco genes que codifican *Small Auxin Up regulated (SAUR)-like proteins* (involucradas en el metabolismo hormonal y la biosíntesis de hormonas) que disminuyen su asociación a polisomas en respuesta a la infección rizobiana. Las muestras de RNA total se muestran en azul y las muestras de RNA TRAP en verde. Los modelos génicos están esquematizados en la parte inferior. Los números en la parte superior izquierda indican el valor máximo de lecturas de la escala, que fue el mismo para todas las muestras.

3. La infección rizobiana introduce cambios en la carga de los mRNAs a los ribosomas

La asociación de los mRNAs a los ribosomas (RL, por *Ribosome Loading*), calculada como la relación de la expresión en las muestras de RNA TRAP *versus* la expresión en las muestras de RNA total, se considera una estimación directa de la eficiencia de la utilización de mRNAs para la síntesis de proteínas y un parámetro crítico para evaluar la contribución del nivel de regulación traduccional. Para obtener una estimación de la dinámica de la asociación de mRNAs a polisomas durante la infección rizobiana, se calculó el RL para todos los genes expresados en las muestras *mock* y en las muestras inoculadas con *S. meliloti*. El RL de los genes individuales presentó un cambio (*fold change*) de hasta 250 veces en las raíces *mock versus* las inoculadas con *S. meliloti* (Figura 14A). El análisis estadístico de estos datos permitió identificar 532 genes (2,4% del total) que aumentaron y 503 genes (2,3%) que disminuyeron su RL en respuesta a *S. meliloti* (Figura 14B) (Tabla Suplementaria 5).

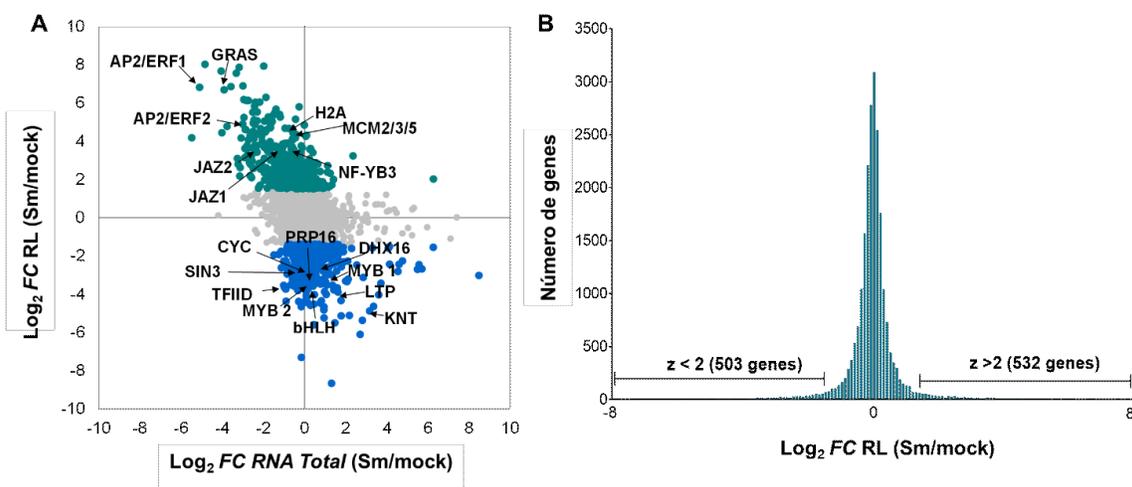


Figura 14. Cambios en la carga de mRNAs a los ribosomas (RL) en respuesta a *S. meliloti*. A. Diagrama de dispersión del *fold change* (FC) de RL, calculada como la relación de los FPKM en muestras de RNA TRAP de raíces *mock* frente a raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm) versus el FC de las muestras de RNA Total de raíces *mock* frente a raíces Sm. Los genes que aumentaron su RL en respuesta a la infección rizobiana están coloreados en verde; los genes que disminuyeron su RL en respuesta a la infección rizobiana están coloreados en azul. Ciertos genes están indicados: *AP2/ERF 1* (*APETALA 2/Ethylene Response Factor 1*, Medtr4g086190), *AP2/ERF 2* (Medtr4g086165), *JAZ 1* (*jasmonate zim-domain protein 1*, Medtr5g013520), *JAZ 2* (Medtr5g013530), *GRAS* (*GRAS family transcription factor*, Medtr4g122240), *H2A* (core Histone

H2A, Medtr7g027610), *MCM2/3/5* (*minichromosome maintenance family protein 2/3/5*, Medtr8g005255), *NF-YB3* (Nuclear transcription factor Y subunit B-3, Medtr4g133952), *LTP* (Lipid Transfer protein, Medtr7g094650), *KTN* (*knotted 1-binding protein*, Medtr4g118050), *TFIID* (*transcription initiation factor TFIID protein*, Medtr0268s0020), *Sin3* (*paired amphipathic helix SIN3-like protein*, Medtr8g062700), *MYB1* (*MYB family transcription factor 1*, Medtr4g123040), *MYB2* (Medtr5g020170), *DHX16* (*pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16*, Medtr1g010030), *PRP16* (*pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16*, Medtr1543s0010) y *CYC* (*cyclin-like F box protein*, Medtr7g098510). **B.** Histograma que muestra el cambio (FC: *fold change*) de RL entre muestras *mock* e inoculadas con *S. meliloti*. z (z Score) representa la distancia de la media en términos de desviaciones estándar.

Los genes con cambios significativos en su RL se clasificaron en categorías funcionales basadas en Gene Ontology (GO) seguido de una inspección manual y reclasificación de los genes individuales (Figura 15A). Un número importante de estos genes pertenecen a la categoría *regulación transcripcional*, con 108 genes que codifican factores de transcripción. La clasificación de estos factores de transcripción reveló que APETALA 2/*Ethylene Response Factor* (AP2/ERF) y MYB fueron las familias más representadas. Ejemplos de genes con RL aumentado son aquellos que codifican las proteínas JAZ, una subunidad B del complejo NF-Y y *MADS-box binding proteins*, mientras que los genes con RL reducido incluyen aquellos que codifican tanto factores de transcripción generales, como por ejemplo, TFIID y el represor co-transcripcional *Paired amphipathic helix protein Sin3-like 3*, así como también factores de transcripción específicos de las familias KNT, MYB, GRAS y bHLH. Dentro del grupo con RL reducido se encontraron también genes con funciones en *splicing* (por ejemplo, los factores de *splicing ATP-dependent RNA helicases* DHX16 y PRP16) o en la progresión del ciclo celular (*cyclin-like F box protein*) (Figura 15B) (Tabla Suplementaria 6). Estos resultados muestran que la expresión génica durante etapas tempranas de la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti* está sujeta a una fuerte reprogramación a nivel traduccional que opera sobre la producción de factores de transcripción y *splicing*, posiblemente modulando la expresión de otros genes que pueden ser requeridos para etapas posteriores de la simbiosis.

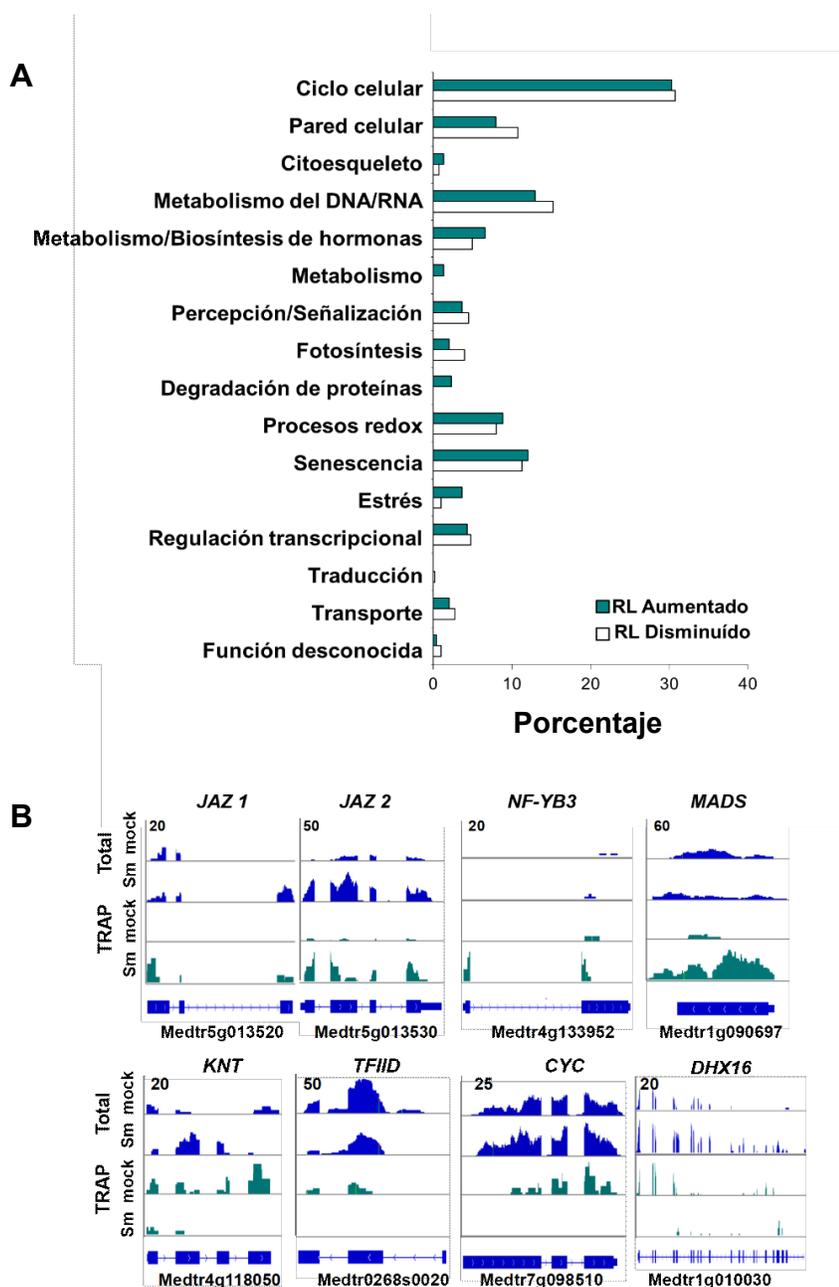


Figura 15. Genes con cambios en la carga de ribosomas (RL) en respuesta a *S. meliloti*. **A.** Clasificación funcional de genes con cambios significativos en sus RLs según *GO* seguido de la inspección manual de genes individuales. Los números indican la cantidad total de genes en cada categoría. Las barras verdes representan los GEDs que aumentan su RL en respuesta a la infección rizobiana; las barras blancas representan los GEDs que disminuyen su RL en respuesta a la infección rizobiana. **B.** Visualización de la distribución de las lecturas de RNA-seq de genes seleccionados que aumentan (panel superior) o disminuyen (panel inferior) su RL en respuesta a la infección rizobiana. Las muestras de RNA total se muestran en azul y las muestras de RNA TRAP en verde. Los modelos génicos están esquematizados en la parte inferior. Los números en la parte superior izquierda indican el valor máximo de lecturas de la escala, que fue el mismo para todas las muestras.

4. Regulación de los mRNAs en traductomas específicos de tejido en respuesta a *S. meliloti*

La metodología TRAP permite el análisis del traductoma específico de un tejido o tipo celular mediante el uso de promotores que dirigen la expresión de la proteína FLAG-RPL18 en determinados tipos celulares (Mustroph *et al.*, 2009). La proteína FLAG-RPL18 se produce y se incorpora en los ribosomas de aquellas células en los que el promotor está activo, por lo que la purificación por afinidad permite capturar sólo los ribosomas y mRNAs provenientes de dichos tipos celulares. Para caracterizar los cambios a nivel traduccional de los transcritos individuales en tejidos específicos de la raíz de *M. truncatula*, se generaron plantas compuestas transformadas con la construcción FLAG-RPL18 bajo el control de los promotores *EXPANSIN 7* (pEXP7) de *M. truncatula*, *Cortex specific transcript* (pCO2) o *SUCROSE TRANSPORT 2* (pSUC2) de *A. thaliana* para su expresión en epidermis, córtex o células acompañantes del floema, respectivamente. Como se mencionó previamente en la introducción, epidermis y córtex son los tejidos donde se expresan los programas genéticos de infección y organogénesis del nódulo (Timmers *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2014), mientras que el floema es el tejido vascular encargado del transporte de fotosintatos (Van Bel and Hafke, 2005). pEXP7 y pCO2 fueron utilizados previamente para dirigir la expresión génica en pelos radicales y en las células corticales en diferenciación, respectivamente, en el contexto de la simbiosis de nódulos radicales (Rival *et al.*, 2012; Vernié *et al.*, 2015). El uso de pSUC2 como un promotor específico del floema se basa en un reporte previo que mostró que la organogénesis de los nódulos involucra una continuidad simplástica entre las células del floema y las que forman parte del primordio nodular (Complainville *et al.*, 2003). La expresión del transcripto *FLAG-RPL18* fue verificada mediante RT-PCR (Figura 16A). La actividad específica de tejido, al igual que la estabilidad de la proteína FLAG-RPL18, fue verificada mediante la expresión de *FLAG-RPL18* unida a *GFP* (*FLAG-GFP-RPL18*) seguida de la observación por microscopía confocal. FLAG-GFP-RPL18 se acumuló en el nucleolo y el citoplasma de las células del tejido epidérmico, cortical o de floema según la expresión estuvo controlada por los promotores pEXP7, pCO2 o pSUC2, respectivamente (Figura 16B). La expresión de *FLAG-RPL18* dirigida por los promotores pEXP7, pCO2 o pSUC2 no afectó el crecimiento ni el desarrollo de la raíz en lo que hace a la longitud de

la raíz principal o la densidad y longitud de las raíces laterales, ni tampoco de la parte aérea, determinada como altura del tallo y número de hojas de las plantas compuestas (Figura 16C).

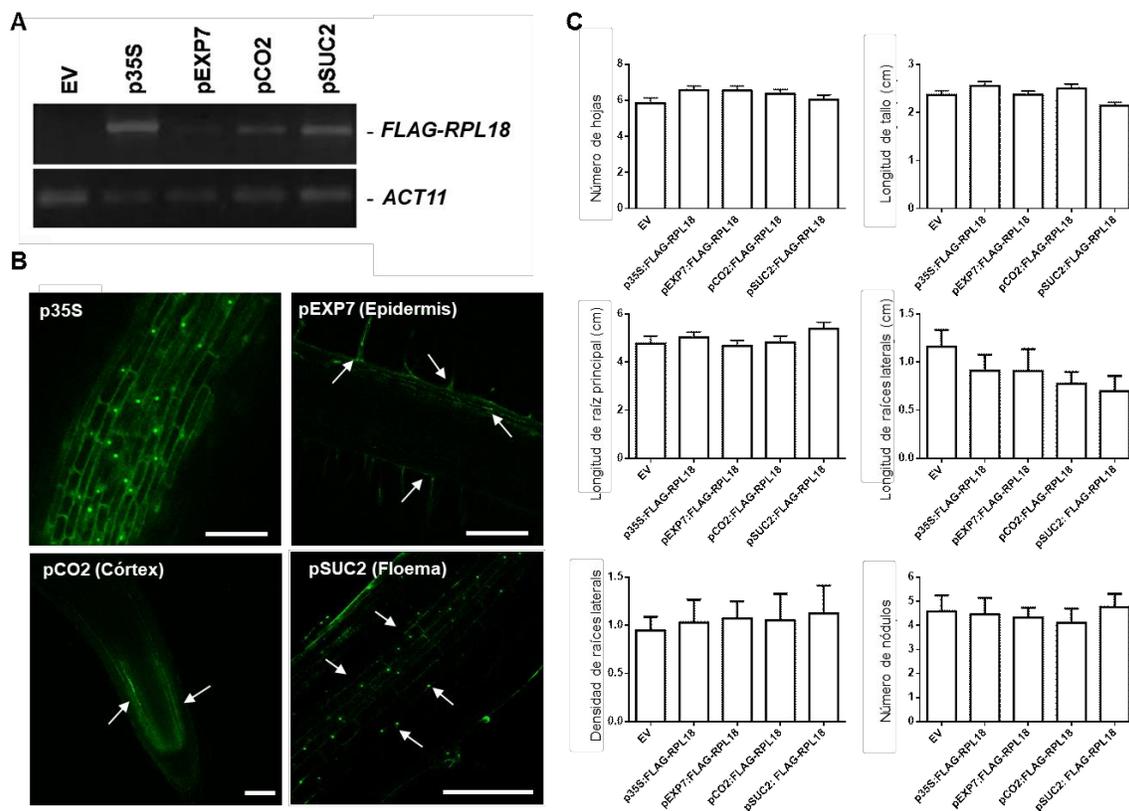


Figura 16. Expresión de *FLAG-GFP-RPL18* en tipos celulares de la raíz de *M. truncatula*. **A.** Verificación de la expresión de *FLAG-RPL18* a partir de raíces transformadas con las construcciones p35S:HF (EV), p35S:FLAG-RPL18 (p35S), pEXP7:FLAG-RPL18 (pEXP7), pCO2:FLAG-RPL18 (pCO2) y pSUC2:FLAG-RPL18 (pSUC2) mediante RT-PCR. Se utilizaron el *primer* RPL18 F ubicado al inicio de la región codificante de RPL18 y el *primer* 3'ocs ubicado en la región 3'UTR ocs (Tabla 4, Anexo1. Primers). El tamaño esperado corresponde a 646 pb. En el panel inferior se muestra la amplificación de *ACTINA11* (*ACT11*) utilizando los *primers* ACT F y ACT R a partir de las mismas muestras. **B.** Microscopía confocal de raíces de plantas compuestas transformadas con la construcción *FLAG-GFP-RPL18B* bajo el control de los promotores CaMV 35S, pEXP7, pCO2 o pSUC2. Las flechas señalan la epidermis y los pelos radicales en pEXP7, el tejido cortical en pCO2 y las células acompañantes del floema en pSUC2. La barra de escala corresponde a 100 μ m. **C.** Análisis fenotípico de raíces y parte aérea de plantas transformadas con las construcciones p35S, pEXP7, pCO2 o pSUC2: FLAG-RPL18. Se muestra la cuantificación del número de hojas por planta, la longitud del tallo, la longitud de la raíz principal, la longitud de raíces laterales, la densidad de raíces laterales cuantificada como número de raíces laterales por cm de raíz primaria, y el número de nódulos por raíz. Todos los datos se tomaron de plantas compuestas 5 semanas después de la transformación, con excepción del número de nódulos, que se tomó de plantas compuestas a los 21 dpi. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar (SEM, por *standard error of the mean*) de tres réplicas biológicas independientes realizadas con más de 25 plantas compuestas en cada una.

Se realizaron experimentos de TRAP utilizando raíces transgénicas que expresan la construcción FLAG-RPL18 bajo el control del promotor p35S o de los tres promotores específicos de tejido mencionados. Los niveles relativos de transcripto de un grupo de GEDs fueron examinados por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) en el transcriptoma (RNA Total) y el traductoma (RNA TRAP) de la raíz. Los GEDs seleccionados incluyeron cuatro genes descritos como inducidos por la inoculación con *S. meliloti*, *ERN1*, *NF-YAI*, *NPL* y *SINA*, y cuatro genes identificados en este estudio como regulados negativamente a nivel traduccional en respuesta a la infección rizobiana, los cuales codifican una cysteine-rich receptor-like kinase (Cys-rich RLK), un Nodule cysteine-rich peptide (NCR) y dos de las proteínas SAUR-like presentadas en la sección 2 de este capítulo. Los transcriptos *ERN1*, *NF-YAI* y *NPL* se encontraron enriquecidos en el traductoma de células epidérmicas, mientras que *SINA* se acumuló a mayores niveles en el traductoma del córtex tras la inoculación con *S. meliloti*. Tanto *Cys-rich RLK* como uno de los genes *SAUR* (Medtr8g026730) se encontraron regulados negativamente de manera específica en el traductoma de la epidermis y el transcripto *NCR* mostró una disminución en el traductoma de epidermis y córtex, mientras que el otro gen *SAUR* (Medtr4g072190) analizado disminuyó su asociación a polisomas en tejido cortical y en células acompañantes de floema. Estos resultados indican que los experimentos TRAP pueden revelar la regulación específica de tipo de celular a nivel traduccional y, además, que la regulación de la traducción funciona de manera independiente en los diferentes tipos celulares implicados en la simbiosis (Figura 17).

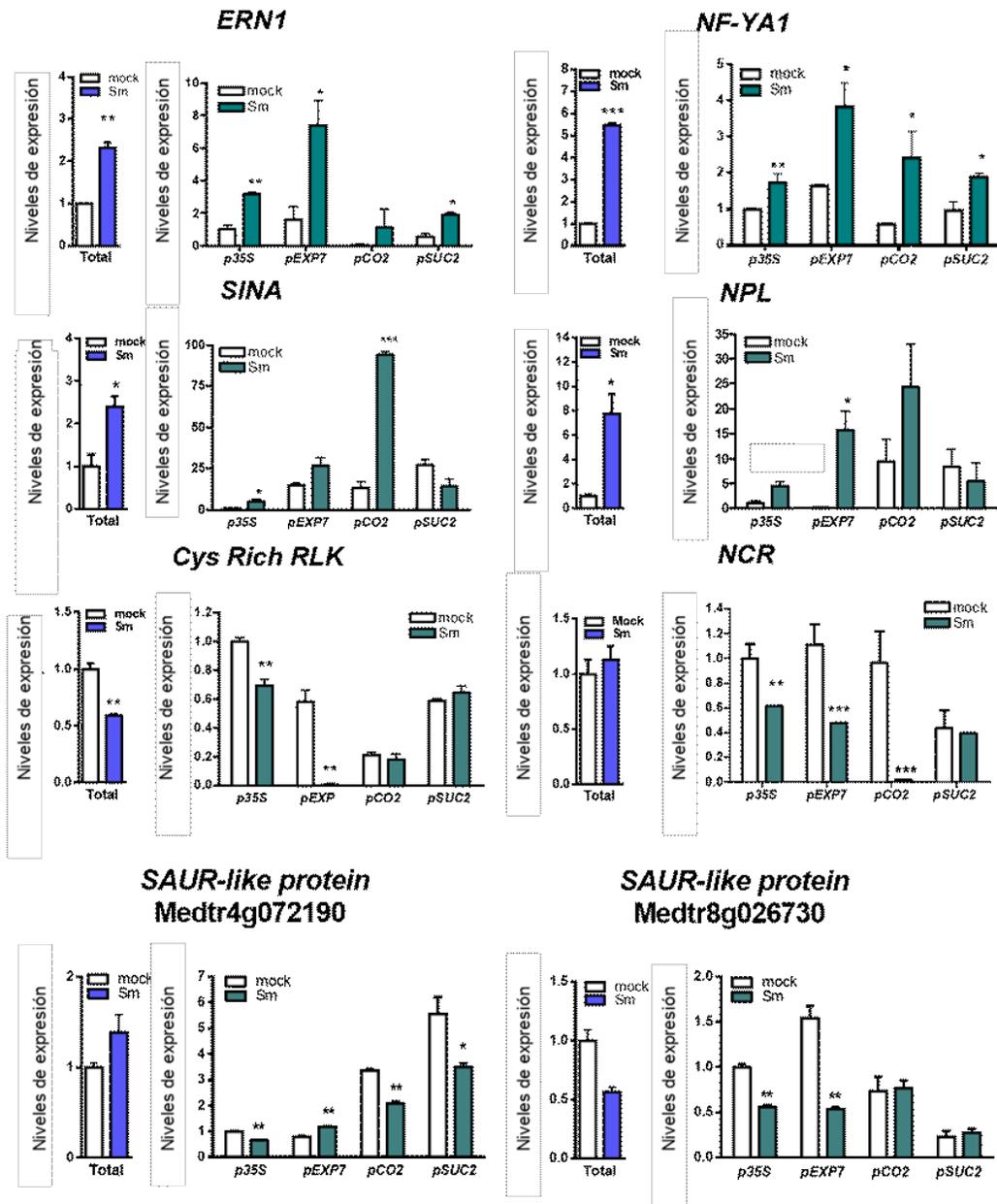


Figura 17. Validación mediante RT-qPCR de los niveles de transcritos de genes seleccionados. Abundancia relativa de transcritos correspondientes a genes seleccionados en muestras de RNA total (paneles de la izquierda, coloreados en azul y blanco) y RNA TRAP (paneles de la derecha, coloreados en verde y blanco) inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o agua (*mock*) obtenidas de raíces que expresan la proteína FLAG-RPL18 en casi todos los tipos celulares de la raíz (p35S), en células epidérmicas (pEXP7), en células corticales (pCO2) o células acompañantes del floema (pSUC2). Los valores de expresión se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando los pares de *primers* ERN1 F/ERN1 R, NF-YA1 F/NF-YA1 R, SINA F/SINA R/ NPL F/NPL R, Cys F/Cys R y NCR F/NCR R, y fueron normalizados respecto de los valores de expresión de los transcritos *HIS3L* y expresados con relación a la muestra total *mock* en las muestras totales o a la muestra *mock* p35S en los experimentos de TRAP específicos de tejido. Cada barra representa la media \pm SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

5. Análisis de las variantes alternativas de transcripto reguladas diferencialmente a nivel traduccional en distintos tejidos en respuesta a *S. meliloti*

Las variantes de transcripto alternativas presentes en los transcriptomas eucariotas son el resultado de eventos de *splicing* alternativo producidos por retención de intrones, omisión o inclusión de exones o por el uso de sitios de empalme dadores 5' o aceptores 3' alternativos (Reddy *et al.*, 2013), pero también producto del uso de sitios alternativos de inicio de la transcripción (ATSS, por *Alternative Transcriptional Start Site*) o sitios de corte y poliadenilación alternativos (APA, por *Alternative Polyadenylation*) (Reddy *et al.*, 2013; de Lorenzo *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se utilizaron los programas *Tophat2* y *Cufflinks* para identificar y cuantificar las variantes de transcriptos presentes en el transcriptoma y traductoma de raíces de *M. truncatula* e identificar aquellas variantes que presenten una asociación diferencial a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación. Sólo se consideraron como transcriptos alternativos aquellos modelos que tuvieran al menos diez lecturas que sustentaran dicha variante de transcripto. A nivel traduccional se identificaron 328 transcriptos expresados diferencialmente (de aquí en adelante TEDs), de las cuales el 51 % aumentó su asociación a la maquinaria traduccional y el 49 % mostró el comportamiento opuesto (Tabla Suplementaria 7). La comparación de GEDs y TEDs a nivel traduccional reveló 132 genes que producen una o más variantes de transcripto que cambian su abundancia en el traductoma de raíces inoculadas con *S. meliloti* en comparación con el de las inoculadas con agua, pero que la suma de la abundancia de dichas variantes no se ve afectada por la inoculación. Es decir, estos son TEDs, pero no GEDs. De estas 132 variantes de transcriptos, el 34 % mostró regulación positiva y el 66 % regulación negativa en respuesta a la inoculación. Una inspección detallada de estos 132 TEDs reveló que más de la mitad de los genes con al menos una variante de transcripto expresada diferencialmente sufre *splicing* alternativo (retención de intrones, omisión o inclusión de exones o sitios de empalme 5' donador o 3' aceptor alternativo), mientras que el 35 % muestra uso ATSS y una proporción menor (9 %) se encuentra sujeta a APA. Dentro del grupo de TEDs que aumentan su asociación a la maquinaria traduccional se encontraron algunos que codifican para proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina, tales como una *cysteine-rich polycomb-like protein*, una *paired amphipathic helix SIN3-like protein* involucrada en

la represión transcripcional mediante la interacción con histonas desacetilasas y una *histone lysine (Lys)-specific demethylase 1* (LSD1). Curiosamente, los TEDs regulados negativamente también incluyeron transcritos que codifican proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina o en la modificación de marcas epigenéticas, incluida la histona H2A, una *histone deacetylation protein*, una *chromatin-associated DEK-C terminal domain containing protein*, una *DNA binding protein with bromodomains* (la cual es un componente crítico de muchos complejos de proteínas involucrados en la remodelación de la cromatina) y una *E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like protein* (involucrada en la ubiquitinación de la histona H2B, que proporciona una marca específica para la activación transcripcional). Dentro de los TEDs regulados negativamente también encontramos una variante de transcritos del gen *LSD1* mencionado anteriormente (Medtr1g094740) y una variante de transcritos del gen Medtr7g033685, que codifica una proteína con una alta identidad de secuencia a la proteína *Defective In Meristem Silencing 4/RNA-Directed DNA Methylation 4 (DMS4/RDM4)* de *A. thaliana*. DMS4/RDM4 ha sido involucrada en el mecanismo de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM) mencionado en la Introducción.

El caso del *splicing* alternativo del gen *LSD1*, Medtr1g094740, fue de particular interés, ya que las dos isoformas de transcritos generadas a partir de este gen mostraron una regulación traduccional opuesta en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*: la isoforma larga denominada *LSD1* aumenta, mientras que la isoforma corta denominada *ALT LSD1* disminuye su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta al rizobio. Las dos variantes de transcritos del gen *LSD1* se producen por omisión o inclusión del tercer exón (Figura 18A). La inclusión de este exón produce la variante de transcritos *LSD1* (TCONS_00010022) que codifica la proteína LSD1 de longitud completa, por lo que denominamos a esta variante *LSD1*. La omisión del exón produce la variante *ALT LSD1* (TCONS_00010021), que introduce un codón de terminación prematuro. Teniendo en cuenta que la isoforma *ALT LSD1* no se encuentra dentro de los modelos génicos definidos en el genoma de *M. truncatula* versión 4.0 (Mtv4.0, Young *et al.* 2011), la existencia de ambas isoformas se verificó mediante una reacción de RT-PCR utilizando los *primers* LSD1Sp F y LSD1Sp R ubicados en los exones flanqueantes al sitio de *splicing* alternativo (Figura 18B). Las proteínas LSD1 son demetilinas específicas de histonas, una gran familia

de proteínas que contienen un dominio catalítico Jumonji carboxi terminal (JmjC) que media la demetilación oxidativa de lisinas mono-, di- y tri-metiladas (Tsukada *et al.*, 2006; Shi and Whetstone, 2007). El gen *LSD1* de *M. truncatula* identificado en este estudio es el ortólogo putativo de *Early Flowering 6 (ELF6)/AtPKDM9B* de *Arabidopsis thaliana* (Noh *et al.*, 2004), que da origen a una proteína de la subfamilia PKDM9. Las proteínas de esta subfamilia específica de plantas contienen un dominio Jmj adicional en el extremo amino (JmjN), cuatro dominios zinc finger cerca del extremo C-terminal y sitios de unión a los cofactores Fe y α -cetoglutarato (α -KG) (Qian *et al.*, 2015). La isoforma *LSD1* produce una proteína que contiene los dominios JmjN, JmjC, zinc fingers, y sitios de unión a Fe y α -KG. La isoforma *ALT LSD1* introduce un codón de terminación prematuro dentro de la región que codifica el dominio JmjC, por lo tanto, este transcripto podría estar sujeto a NMD o dar lugar a una proteína truncada que carece de los sitios que codifican para los dominios zinc fingers, así como también de los sitios de unión a cofactores, por lo cual la proteína podría no ser funcional (Figura 18C). El aumento de la variante transcripcional *LSD1* en el traductoma de raíces de *M. truncatula* inoculadas se confirmó mediante RT-qPCR utilizando los *primers* LSD1 F y LSD1 R, mientras que la inspección de los traductomas específicos de tejido reveló que esta variante está regulada positivamente en los traductomas de córtex y células acompañantes del floema en respuesta a la inoculación con rizobios, pero disminuye en el traductoma de epidermis (Figura 18D). El caso del gen *LSD1* ejemplifica cómo la expresión génica puede ser modulada a múltiples niveles, como el *splicing* alternativo y la traducción, así como también esta modulación puede verse afectada por el contexto celular.

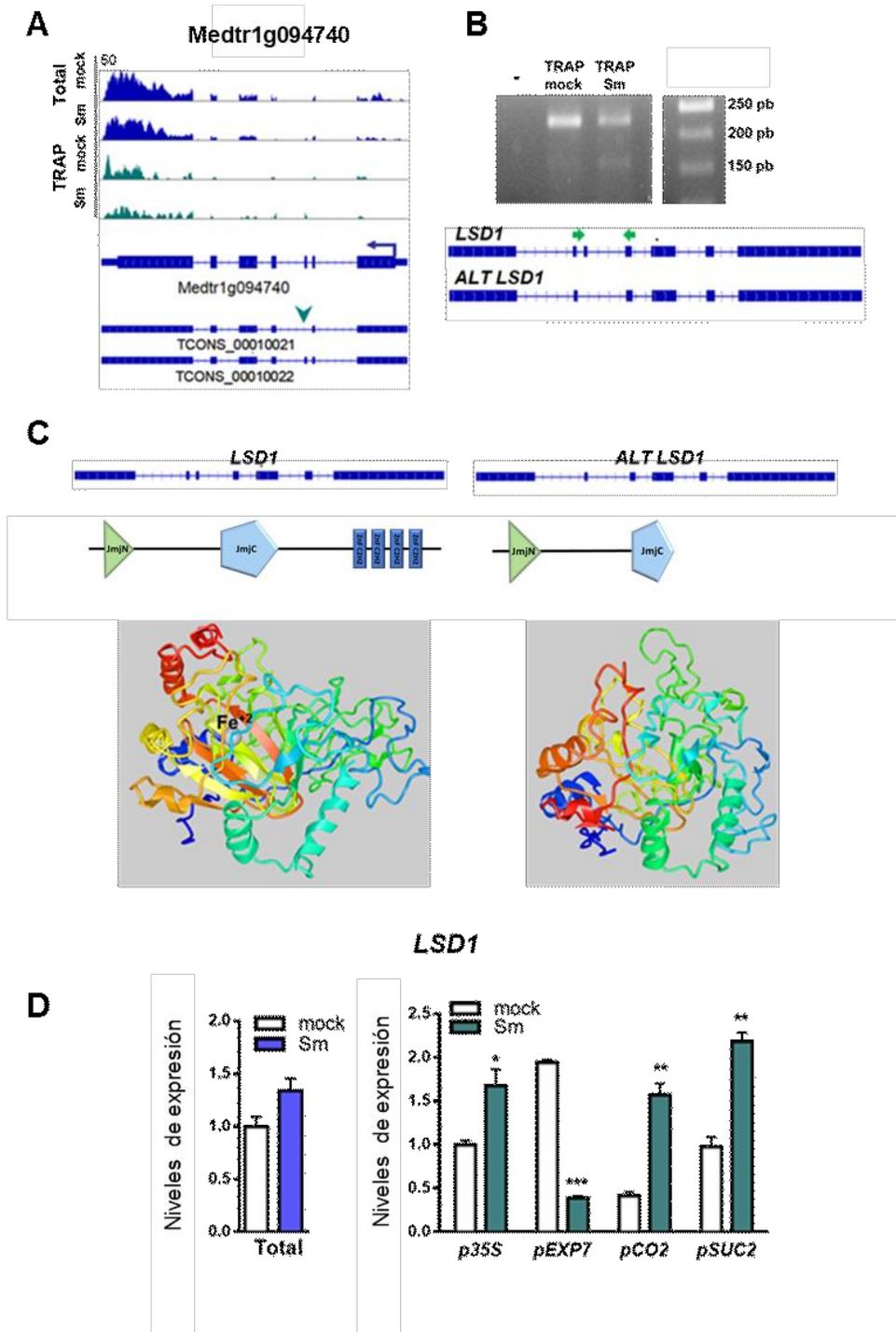


Figura 18. Expresión de los transcritos alternativos del gen Medtr1g094740. **A.** Distribución de las lecturas de RNA-seq de las isoformas de transcritos de Medtr1g094740 en muestras de RNA Total (azul) y RNA TRAP (verde) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* (Sm). El modelo génico y sus variantes de transcritos están esquematizados debajo. La flecha azul indica el sitio canónico de inicio de la traducción. La punta de flecha verde indica el evento de inclusión/omisión de exón que diferencia a los transcritos *LSD1* (TCONS_000110022) y *ALT LSD1* (TCONS_000110021). **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los transcritos *LSD1* y *ALT LSD1* en muestras RNA TRAP inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*). Los tamaños de los fragmentos amplificados a partir de

muestras de RNA TRAP *mock* y Sm, utilizando los *primers* LSD1Sp F y LSD1Sp R, corresponden a 219 pb para el caso de la isoforma *LSD1* y 150 pb en el caso *ALT LSD1*. La calle de la derecha corresponde al marcador de peso molecular de 50 pares de bases. *LSD1* y *ALT LSD1* están esquematizadas en el panel inferior. Las flechas verdes indican la posición de los *primers* diseñados para verificar el evento de *splicing*. **C.** Panel superior: esquema de los dominios proteicos presentes en *LSD1* y *ALT LSD1*. Se esquematizan los dominios JmjN (triángulo verde), JmjC (pentágono celeste) y zinc fingers (rectángulos azules). Panel inferior: modelización de *LSD1* y *ALT LSD1*; Fe⁺² indica el sitio de unión a este cofactor. **D.** Validación mediante RT-qPCR de los niveles de la variante *LSD1*. Abundancia relativa de los transcriptos en muestras de RNA total (panel de la izquierda, coloreado en azul y blanco) y RNA TRAP (panel de la derecha, coloreado en verde y blanco) obtenidas de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o agua (*mock*) que expresan la proteína FLAG-RPL18 en casi todas las células de la raíz (p35S), en células epidérmicas (pEXP7), en células corticales (pCO2) o células acompañantes del floema (pSUC2). Se utilizaron los *primers* LSD1 F y LSD R. Los valores de expresión fueron normalizados con los valores del transcripto *HIS3L* y expresados en relación a la muestra total *mock* o la muestra *mock* p35S para el RNA total o RNA TRAP, respectivamente. Cada barra representa la media ± SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

Otro ejemplo interesante de variantes alternativas de transcriptos reguladas diferencialmente en el traductoma es Medtr7g033685, ortólogo putativo del gen *DMS4/RDM4* de *A. thaliana*. Los mutantes de este gen en *A. thaliana* exhiben un fenotipo de desarrollo pleiotrópico y están afectadas en la producción de RNAs de interferencia secundarios dependiente de la RNA Pol IV (He *et al.*, 2009; Kanno *et al.*, 2010). En los datos de RNA-seq se identificaron tres variantes de transcripto diferentes generadas a partir de Medtr7g033685 (Figura 19A); la variante más larga (TCONS_00065714), fue designada *RDM4*, mientras que TCONS_00065713 es 6 nucleótidos más corta debido a un sitio aceptor 3' alternativo en el exón 10 y fue designada como *ALT1 RDM4*. La variante más corta (TCONS_00065710, denominada *ALT2 RDM4*) es producida por un ATSS alternativo que excluye los primeros tres exones; sin embargo, esta variante conserva un exón que se excluye en las variantes *RDM4* o *ALT1 RDM4*. Notablemente, la variante más larga *RDM4*, fue detectada por TRAP-seq en el traductoma de raíces no inoculadas, pero apenas detectada en la de las raíces inoculadas con *S. meliloti*. Los experimentos de RT-qPCR utilizando *primers* específicos para detectar la variante *RDM4* (*RDM4 F* y *RDM4 R*) verificaron su regulación negativa en el traductoma (RNA TRAP) de raíz completa luego de la inoculación con *S. meliloti*. El mismo comportamiento se observó en todos los traductomas tejido específicos analizados (Figura 19B).

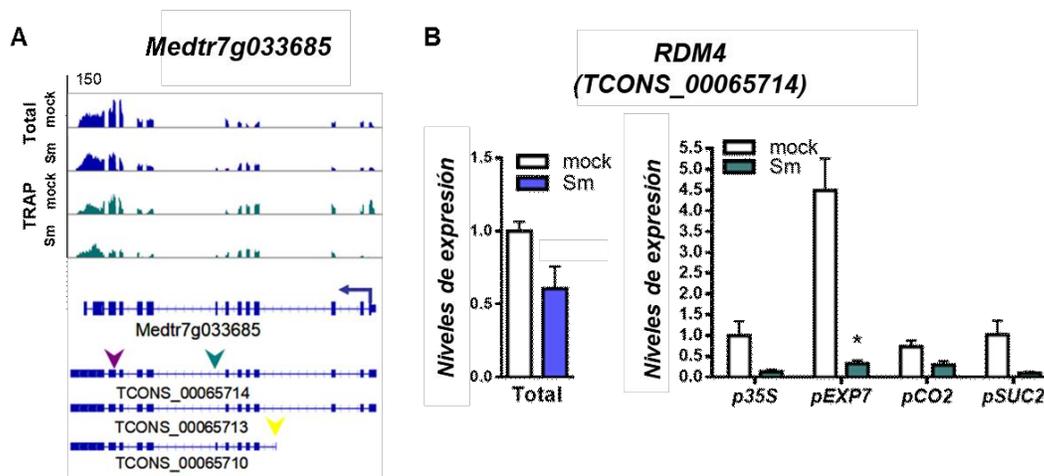


Figura 19. Expresión de los transcritos alternativos del gen Medtr7g033685. **A.** Distribución de las lecturas de RNA-seq de las isoformas de transcritos de Medtr7g033685 en muestras de RNA Total (azul) y RNA TRAP (verde) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* (Sm). Los modelos génicos y sus variantes de transcritos están esquematizados en la parte inferior. La flecha azul indica el sitio canónico de inicio de la traducción. Las puntas de flecha indican un sitio 3' acceptor alternativo (violeta), ATSS alternativo (amarillo) y un evento de inclusión/omisión de exón (verde). **B.** Validación por RT-qPCR de los niveles de *RDM4*. Abundancia relativa de los transcritos en muestras de RNA total (panel de la izquierda, coloreado en azul y blanco) y RNA TRAP (panel de la derecha, coloreado en verde y blanco) obtenidas de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o agua (*mock*) que expresan la proteína FLAG-RPL18 en casi todas las células de la raíz (p35S), en células epidérmicas (pEXP7), en células corticales (pCO2) o células acompañantes del floema (pSUC2). Se utilizaron los *primers* RDM4 F y RDM4 R. Los valores de expresión fueron normalizados con los valores del transcritos *HIS3L* y expresados en relación a la muestra total *mock* o la muestra *mock* p35S para RNA total o RNA TRAP, respectivamente. Cada barra representa la media \pm SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: $p \leq 0.05$)

Un tercer ejemplo notable de TED identificado dentro de la categoría de metabolismo de DNA/RNA está representado por Medtr5g004660, el cual codifica una proteína altamente similar a la subunidad 3 del complejo SUPERKILLER de *S. cerevisiae*, denominada SUPERKILLER3 (SKI3). Como se mencionó en la Introducción, SKI3 es un miembro del complejo SUPERKILLER (SKI) que guía a los mRNAs deadenilados directamente al complejo del exosoma para su degradación en dirección 3'-5' (Halbach *et al.*, 2013, Chantarachot and Bailey-Serres, 2018). Bajo nuestras condiciones experimentales se detectaron tres variantes de transcritos derivadas de Medtr5g004660 (Figura 20A): TCONS_00044660, designado como *SKI3*, es la variante más larga, TCONS_00044662

es 165 nts más corta como consecuencia de un sitio aceptor de *splicing* alternativo 3' en el exón 8 y fue designado como *ALT1 SKI3*, mientras que la tercera variante (TCONS_00044663, denominada *ALT2 SKI3*) se produce por el uso alternativo de ATSS y APA sin que se altere la región codificante. Las variantes *ALT1 SKI3* y *ALT2 SKI3* no cambian su abundancia a nivel de transcriptoma; sin embargo, *ALT1 SKI3* disminuye su asociación a polisomas en respuesta a la infección rizobiana, mientras que *ALT2 SKI3* la aumenta ligeramente. Curiosamente, la variante más larga de *SKI3*, que se encuentra pobremente representada en el transcriptoma, aumenta significativamente su unión a la maquinaria traduccional tras la inoculación con *S. meliloti*. Los experimentos de RT-qPCR usando los *primers* específicos SKI3 F y SKI3 R, que detectan sólo a *SKI3* y *ALT2 SKI3*, confirmaron que estas variantes de transcripto se encuentran reguladas positivamente a nivel traduccional tras la infección rizobiana en la raíz completa. A su vez, también se observó enriquecimiento en todos los traductomas específicos de tejido analizados (Figura 20B).

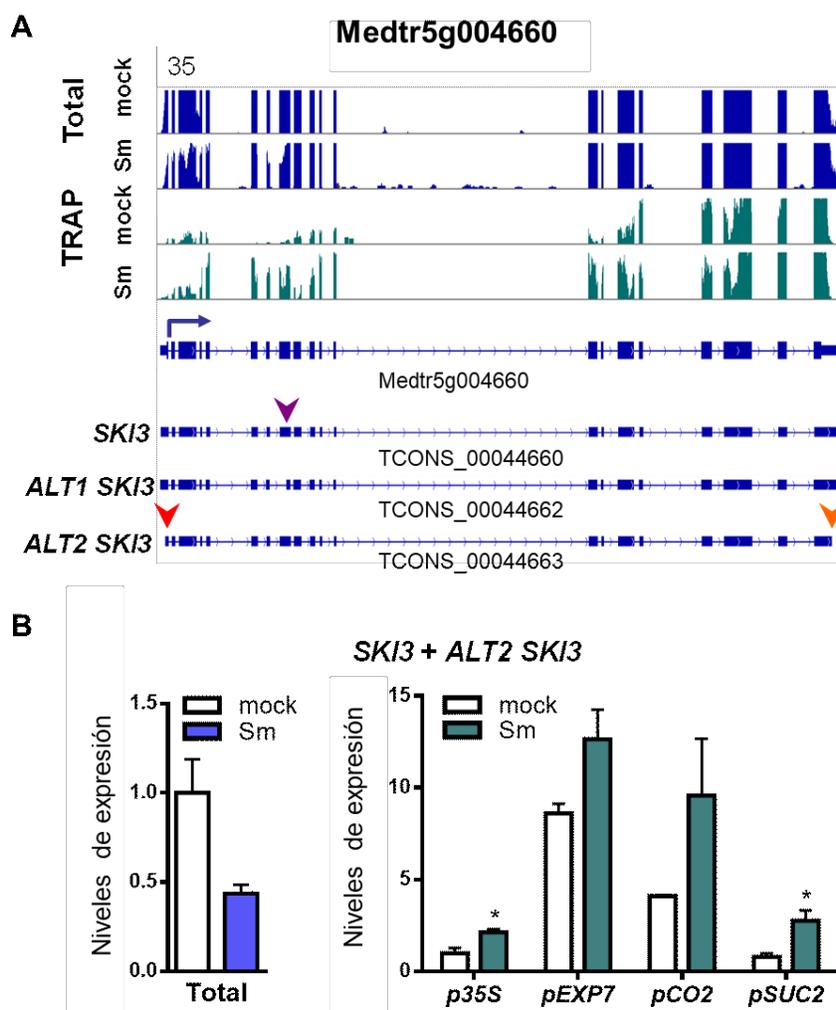


Figura 20. Expresión de los transcritos alternativos de Medtr5g004660. **A.** Distribución de las lecturas de RNA-seq de las isoformas de transcripto de Medtr5g004660 en muestras de RNA Total (azul) y RNA TRAP (verde) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti*. El modelo génico de Medtr5g004660 y sus variantes de transcripto están esquematizados en la parte inferior. La flecha azul indica el sitio canónico de inicio de la traducción. Las puntas de flecha indican un sitio 3' aceptador alternativo (violeta), ATSS alternativo (rojo) y APA alternativo (naranja). **B.** Validación por RT-qPCR de la abundancia relativa de los transcritos de *SKI3* y *ALT2 SKI3* en muestras de RNA total (panel de la izquierda, coloreado en azul y blanco) y RNA TRAP (panel de la derecha, coloreado en verde y blanco) obtenidas de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o agua (*mock*) que expresan la proteína FLAG-RPL18 en casi todas las células de la raíz (p35S), en células epidérmicas (pEXP7), en células corticales (pCO2) o células compañeras del floema (pSUC2). Se utilizaron los *primers* SKI3 F y SKI3 R. Los valores de expresión fueron normalizados con los valores de abundancia del transcripto *HIS3L* y expresados en relación a la muestra total *mock* o la muestra *mock* p35S en las muestras RNA total o RNA TRAP, respectivamente. Cada barra representa la media \pm SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: $p \leq 0.05$).

Los resultados y los ejemplos presentados en esta sección ilustran cómo el análisis de la dinámica de la asociación de los RNAs a la maquinaria traduccional puede contribuir a comprender la reprogramación génica durante el proceso simbiótico. Cabe mencionar que el análisis de TEDs permitió identificar variantes de transcritos específicas reguladas a partir de su asociación a polisomas, las cuales no se identificaron cuando se analizaron los GEDs. Entre estos TEDs se encuentran variantes que codifican proteínas involucradas en la metilación del DNA, en la modificación de histonas y el metabolismo del RNA; es decir que la reprogramación de la expresión génica en respuesta al rizobio es compleja e involucra cambios a nivel de la transcripción y procesamiento alternativo de mRNAs, seguido de un control de la traducibilidad de cada una de las variantes de transcritos. Estos cambios que ocurren en etapas tempranas en la traducción de mRNAs que codifican proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica pueden impactar en los cambios transcripcionales (por ejemplo, remodeladores de la cromatina como LSD1 y RDM4) y post-transcripcionales (SKI3) que ocurren en etapas posteriores de la simbiosis.

Capítulo 2

SUPERKILLER3, una proteína involucrada en la degradación 3'-5' de mRNAs, es requerida para el desarrollo del nódulo y la viabilidad de las bacterias durante la simbiosis

1. Caracterización de la expresión de *SUPERKILLER3* en *Medicago truncatula*

Como se mencionó en el capítulo 1, el análisis de las categorías funcionales de los TEDs mostró que un número importante de los mRNAs regulados a nivel traduccional corresponde a la categoría *metabolismo del DNA/RNA*. El gen Medtr5g004660, perteneciente a esta categoría, codifica una proteína con alto nivel de identidad a SUPERKILLER3 (SKI3) de *S. cerevisiae*, un miembro del complejo SUPERKILLER que guía a los mRNAs directamente al complejo del exosoma para su degradación en la dirección 3'-5' (Halbach *et al.*, 2013, Chantarachot and Bailey-Serres, 2018). La abundancia de las variantes de transcritos que codifican la proteína SKI3 de longitud completa (*SKI3* y *ALT2 SKI3*) no se vio afectada significativamente a nivel de abundancia de RNA Total, pero aumentó significativamente su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Los experimentos de RT-qPCR confirmaron un incremento de la traducción a nivel de raíz completa, así como también en los traductomas de cortéx y células acompañantes de floema. (Figura 20, Capítulo 1). Datos de microarreglos disponibles en sitios públicos (Breakspear *et al.*, 2014) muestran que la abundancia total de los transcritos de Medtr5g004660 no se ve afectada en los pelos radicales a tiempos tempranos luego de la inoculación con *S. meliloti* o NF (Figura 21A). Consistentemente, el nivel estacionario total de las variantes de transcritos generadas a partir del locus *SKI3* (Medtr5g004660) en tejido epidérmico de raíces de *M. truncatula* no se ve afectado a tiempos tempranos luego de la inducción con NF (Figura 21B) (Jaurinaud *et al.* 2016). Por lo tanto, en etapas tempranas de la simbiosis, la regulación de los transcritos generados a partir del locus *SKI3* parece estar controlada principalmente a nivel de la asociación a la maquinaria traduccional. Los datos obtenidos a partir de los estudios de microarreglos reportados por Benedito *et al.*, (2008) indican que estos transcritos se acumulan a niveles altos en nódulos de 14 días en comparación a raíces no inoculadas y a los órganos de la parte aérea de la planta (Figura 21C). Por otra parte, datos de RNA-seq reportados por Roux *et al.*, (2014) muestran que los transcritos generados a partir del locus *SKI3* se expresan mayoritariamente en nódulos de 15 días (Figura 21D), particularmente en la zona de fijación de nitrógeno (Figura 21E).

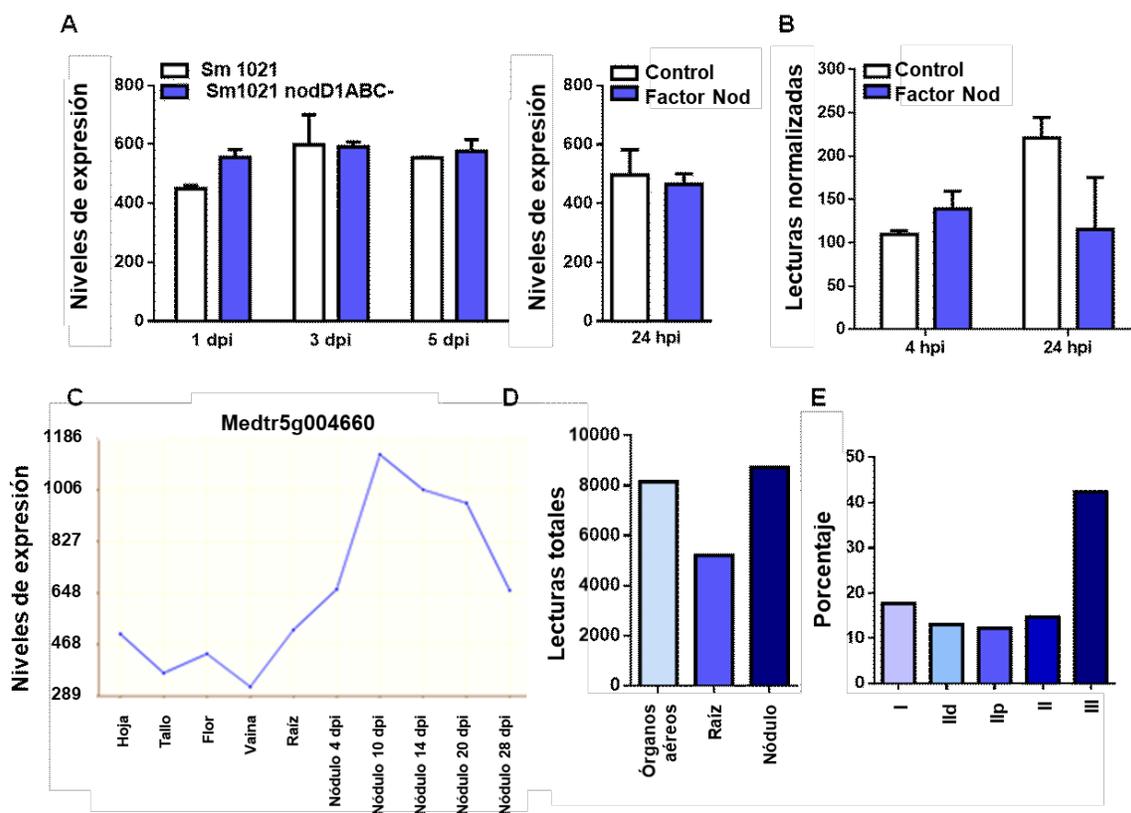


Figura 21. Análisis de expresión de *SKI3* (Medtr5g004660) en *M. truncatula*. **A.** Niveles estacionarios de Medtr5g004660 en pelos radicales de *M. truncatula* a tiempos tempranos luego de la inoculación con *S. meliloti* 1021 o *S. meliloti* 1021 *nodD1ABC*⁻, una cepa mutante deletional que no produce NF (gráfico de la izquierda) o luego de la inoculación con NF (gráfico de la derecha). Datos obtenidos de estudios de microarreglos (Breakspear *et al.*, 2014). **B.** Niveles estacionarios de Medtr5g004660 en tejido epidérmico de raíces de *M. truncatula* tratadas con NF. Datos obtenidos de RNA-seq (Jaurinaud *et al.* 2016). **C.** Niveles estacionarios de Medtr5g004660 en diferentes tejidos y órganos de *M. truncatula*. Datos obtenidos de estudios de microarreglos (Benedito *et al.* 2008). **D.** Niveles estacionarios de Medtr5g004660 en tejido aéreo, raíces y nódulos de 15 dpi. Datos obtenidos por RNA-seq (Roux *et al.*, 2014). **E.** Niveles estacionarios de Medtr5g004660 en las distintas zonas de nódulo de 15 días obtenidas por microdissección láser. I: región apical con células pequeñas correspondiente a la zona meristemática; IIp: zona de infección; IId: zona de diferenciación; II/III: interzona y III: zona de fijación de nitrógeno. Los datos de RNA-seq de diferentes zonas del nódulo fueron obtenidos por RNA-seq (Roux *et al.*, 2014).

Los resultados de expresión analizados sugieren que Medtr5g004660 es regulado a nivel traduccional en etapas tempranas de la simbiosis y posteriormente a nivel transcripcional durante el desarrollo del nódulo, por lo que se decidió investigar su función durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. Para ello se utilizó una estrategia de silenciamiento post-

transcripcional mediado por RNA de interferencia (RNAi). Se obtuvieron raíces transgénicas mediante transformación por *A. rhizogenes* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), un proceso que permite generar plantas compuestas con una parte aérea salvaje y un sistema radical transgénico. Se seleccionaron dos regiones para dirigir el silenciamiento post-transcripcional de Medtr5g004660 mediado por RNAi. La primera corresponde a un fragmento de 161 pb ubicado en la secuencia 3' -UTR, común a las tres variantes de transcripto generadas a partir del gen, mientras que la segunda se encuentra dentro de la secuencia de 165 nucleótidos presente en el exón 8, de forma que sólo se encuentra en las variantes *SKI3* y *ALT2 SKI3* (Figura 22A). La búsqueda por homología de secuencia de ambos fragmentos contra la base de datos genómica de *M. truncatula* mostró que sólo tienen similitud con la región a partir de la cual fueron seleccionados, sugiriendo que son secuencias específicas. Estas secuencias fueron amplificadas en reacciones de PCR usando los pares de *primers* SKI3RNAi1 F y SKI3RNAi1 R y SKI3RNAi2 F y SKI3RNAi2 R, respectivamente, y luego clonadas como repeticiones invertidas en el vector pK7GWIWG2D(II) bajo el control del promotor p35S. La expresión de estos RNAi da origen a un RNA con estructura de *hairpin* que dará lugar a la producción de siRNAs. El vector elegido contiene otra unidad transcripcional que produce la expresión del gen de GFP bajo el promotor p35S, lo cual permite seleccionar las raíces transgénicas para los análisis fenotípicos mediante la observación bajo luz UV (Figura 22B) (Karimi *et al.*, 2002).

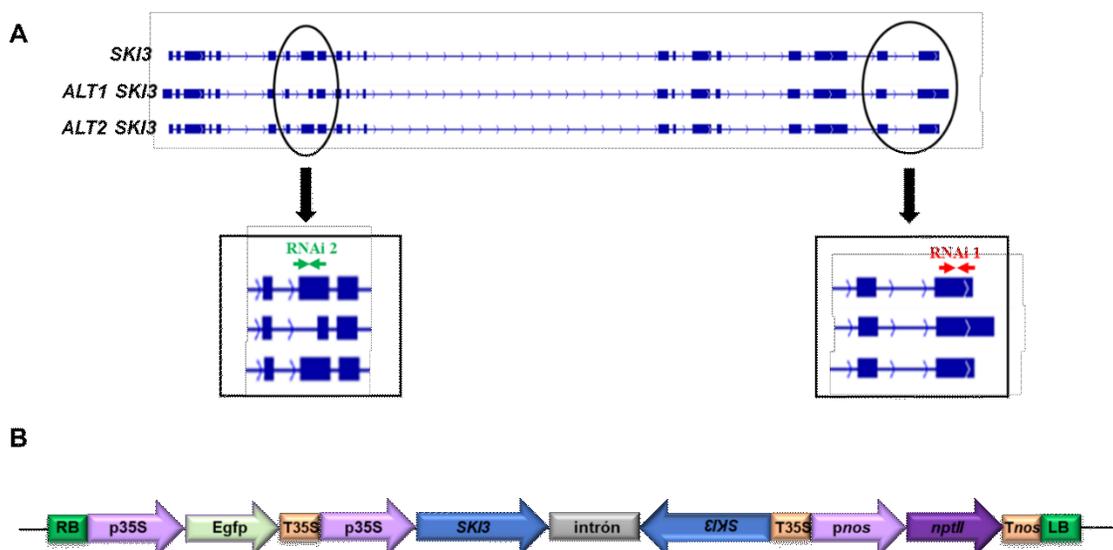


Figura 22. Esquema de la construcción *SKI3* RNAi en el plásmido *pK7GWIWG2D(II)*. **A.** Esquema de las isoformas *SKI3*, *ALT SKI3* y *ALT2 SKI3* y la posición de los *primers* usados para generar las construcciones *SKI3* RNAi1 (rojo) y *SKI3* RNAi2 (verde). **B.** Esquema general de la región del T-DNA del vector de destino conteniendo dos copias del fragmento *SKI3* clonado en orientaciones opuestas, interrumpidas por un intrón. RB y LB representan los bordes derecho e izquierdo del T-DNA. El gen *nptII* codifica la neomicina transferasa, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. El gen de *Egfp*, que codifica la proteína fluorescente verde GFP, permite la selección de las raíces transgénicas. La expresión del RNAi y el gen *Egfp* está bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (p35S) y el terminador T35S. El gen *nptII* está regulado por el promotor *nos* (pnos) y el terminador *Tnos*.

El análisis por RT-qPCR de los niveles de transcritos generados a partir de Medtr5g004660 en raíces transformadas con *SKI3* RNAi1 y *SKI3* RNAi2, mostró que en ambos casos se generó una reducción en los niveles de transcritos de *SKI3* respecto a raíces que fueron transformadas con la construcción control *GUS* RNAi, que contiene un fragmento del gen *uidA*. Este gen, que codifica para la β -glucuronidasa, no tiene un *target* en el genoma de *M. truncatula*. Para las raíces *SKI3* RNAi1 (de aquí en adelante *SKI3* RNAi) el silenciamiento fue de más del 90 %, mientras que para *SKI3* RNAi2 fue de más del 85 % (Figura 23).

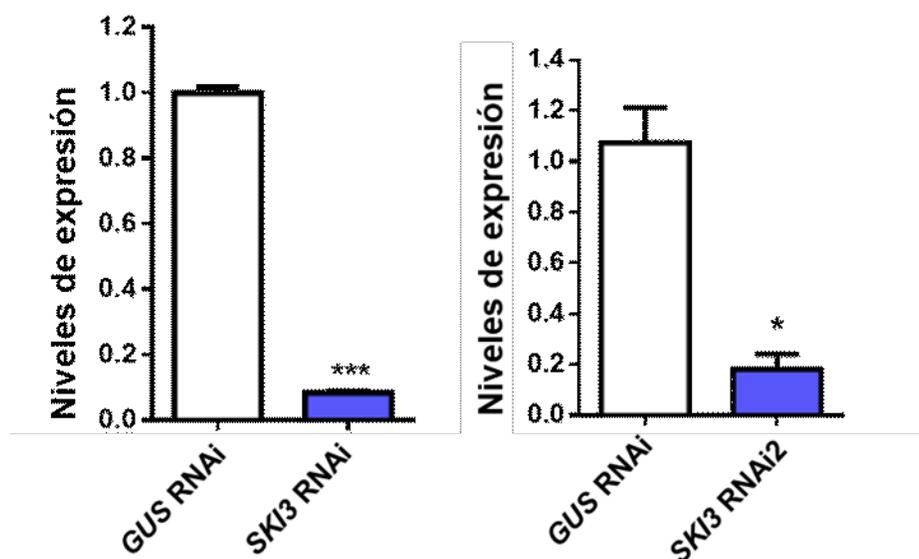


Figura 23. Silenciamiento postranscripcional de *SKI3*. Niveles de expresión relativa de *SKI3* en plantas transformadas con *SKI3* RNAi (izquierda) o *SKI3* RNAi2 (derecha) usando *GUS* RNAi como control. Los valores de expresión se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando los pares de *primers* *SKI3* F y *SKI3* R. Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un t-test con $p < 0,05$ *. Los datos fueron normalizados respecto a los valores de expresión de *HIS3L* y expresados en relación a *GUS* RNAi. El resultado es representativo de 3 réplicas biológicas.

2. *SUPERKILLER3* no es requerida para el desarrollo de la raíz, pero si para la organogénesis del nódulo

Con el objetivo de determinar la función biológica de *SKI3* en la raíz se generaron plantas compuestas transformadas con las construcciones *SKI3* RNAi y *GUS* RNAi como control. La reducción de los niveles de *SKI3* generada mediante la expresión de *SKI3* RNAi1 no afectó el crecimiento ni el desarrollo de la raíz principal (Figura 24A) o la longitud y densidad de las raíces laterales (Figuras 24B y 24C). La reducción de los niveles de *SKI3* tampoco afectó la altura del tallo (Figura 24D) ni el número de hojas de las plantas compuestas (Figura 24E). Por lo tanto, el silenciamiento de *SKI3* no afecta el desarrollo del sistema radical ni, a través de un efecto indirecto, la parte aérea no transformada de *M. truncatula*.

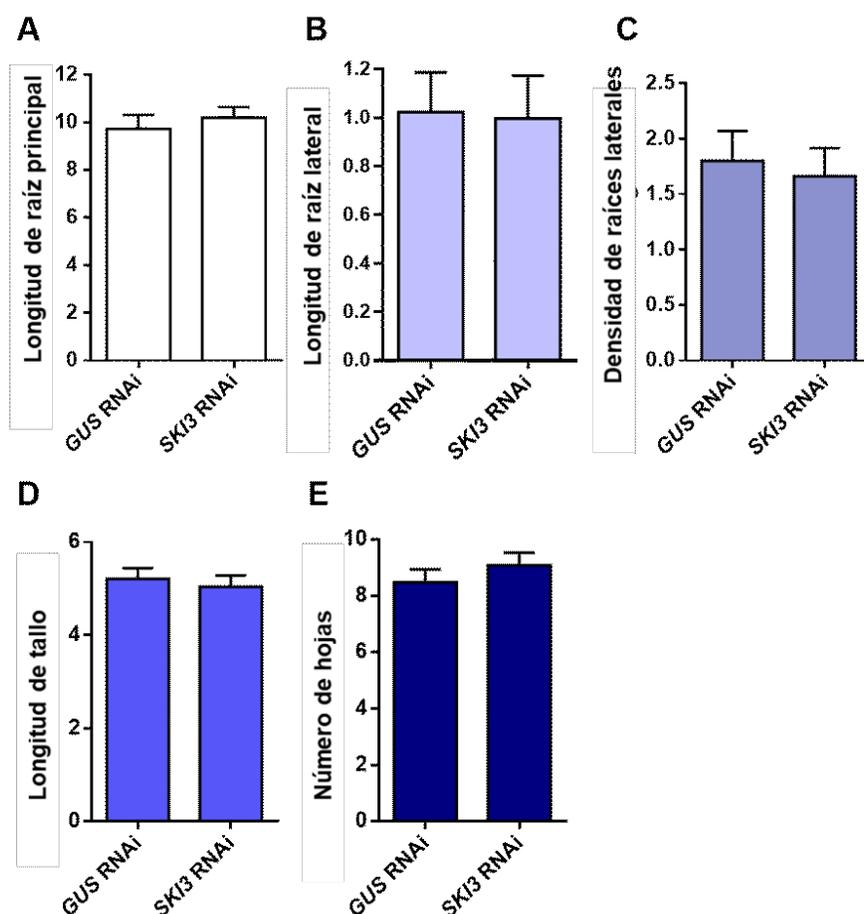


Figura 24. Análisis fenotípico de raíces y parte aérea de plantas *GUS RNAi* y *SKI3 RNAi*. A. Longitud de raíz principal. B. Longitud de raíces laterales. C. Densidad de raíces laterales expresada por cm de raíz primaria. D. Longitud del tallo. E. Número de hojas por planta. Todos los datos se tomaron de plantas compuestas 5 semanas después de la transformación. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres réplicas biológicas independientes realizadas con más de 20 plantas compuestas en cada una.

Con el objetivo de determinar si *SKI3* es requerida para el establecimiento de la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno, se inocularon raíces *SKI3 RNAi*, *SKI3 RNAi2* o *GUS RNAi* con *S. meliloti*, y se cuantificó el número de nódulos por raíz a 7, 10, 15 y 21 dpi. Tanto la expresión de *SKI3 RNAi* como la de *SKI3 RNAi2* causaron una reducción significativa en el número de nódulos formados por *S. meliloti*. Las cinéticas de nodulación mostraron que las raíces con niveles disminuidos de *SKI3* por acción del RNAi1 presentan una reducción significativa en el número de nódulos formados por *S. meliloti* a 15 y 21 días

post inoculación (50 % y 40 % de reducción, respectivamente) respecto a las raíces control (Figura 25A). La expresión de la construcción *SKI3* RNAi2 produjo el mismo fenotipo de reducción en el número de nódulos respecto al control *GUS* RNAi a lo largo de la cinética. Las raíces con niveles disminuidos de *SKI3* por acción del RNAi2 presentaron una reducción significativa en el número de nódulos formados por *S. meliloti* a 15 y 21 días post inoculación (60 % y 49 % de reducción, respectivamente) respecto de las raíces control (Figura 25B).

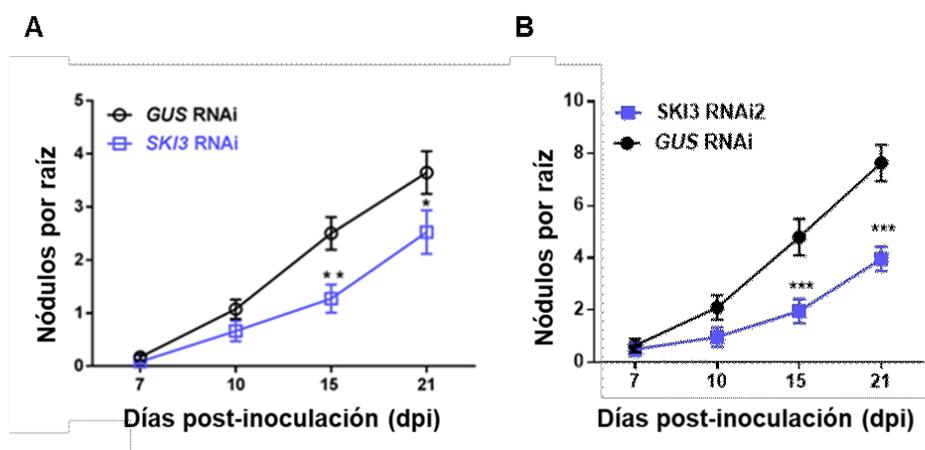


Figura 25. El silenciamiento de *SKI3* afecta negativamente la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*. Se cuantificaron los nódulos formados por raíz transgénica en plantas transformadas con *SKI3* RNAi (A), *SKI3* RNAi2 (B) o *GUS* RNAi como control a los 7, 10, 15 y 21 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media \pm SEM y los asteriscos indican que los valores de *SKI3* RNAi o *SKI3* RNAi2 son estadísticamente significativos respecto al control *GUS* RNAi en un *t-test* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,05$ (**) y $p < 0,01$ (***). Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas independientes. Se evaluaron al menos 35 raíces por réplica y condición.

El tamaño de los nódulos formados fue cuantificado a los 21 dpi con el fin de determinar si el silenciamiento de *SKI3* afecta su desarrollo. Los nódulos formados en raíces *SKI3* RNAi a este tiempo mostraron una reducción significativa de su tamaño respecto al control *GUS* RNAi (Figura 26A). A su vez, el uso de una cepa de *S. meliloti* que expresa la proteína fluorescente roja RFP, permitió observar que los nódulos desarrollados en las raíces *SKI3* RNAi están ocupados por un menor número de bacterias que los nódulos desarrollados en las raíces *GUS* RNAi (Figura 26B).

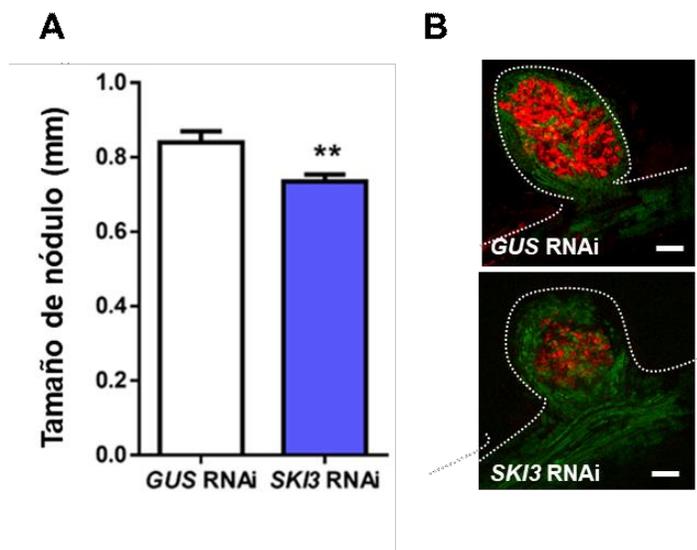


Figura 26. El silenciamiento de *SKI3* afecta el desarrollo de los nódulos. **A.** Tamaño de los nódulos desarrollados en las raíces *SKI3* RNAi y *GUS* RNAi cuantificado a los 21 dpi. Los datos corresponden a la media \pm el SEM. Los asteriscos indican una diferencia significativa respecto al control en un t-test no apareado de dos colas (**, $p < 0,01$). El resultado es representativo de 3 réplicas biológicas. Al menos 65 nódulos fueron medidos en cada condición en cada una de las 3 réplicas. **B.** Imágenes de fluorescencia de nódulos desarrollados en raíces *SKI3* RNAi o *GUS* RNAi a 21 dpi con una cepa de *S. meliloti* que expresa RFP. La imagen se compuso superponiendo la fluorescencia de los canales verde y rojo. El punteado corresponde al contorno del nódulo dibujado a partir de la imagen de contraste diferencial de interferencia DIC (por *Differential Interference Contrast*). La barra de escala corresponde a 0,2 mm.

Además, la mayoría de los nódulos formados en las raíces *SKI3* RNAi fueron blancos y redondos, en contraste con los nódulos rosados y cilíndricos formados en las raíces *GUS* RNAi (Figura 27A y 27B), lo que sugiere que la fijación de nitrógeno se ve comprometida por el silenciamiento de *SKI3*. Esta noción fue respaldada por los menores niveles de transcritos del gen *nifH* de *S. meliloti*, cuantificados mediante RT-qPCR en los nódulos de las raíces que expresan la construcción *SKI3* RNAi en comparación con aquellos de raíces *GUS* RNAi (Figura 27C). El gen *nifH* codifica una subunidad del complejo de la nitrogenasa, complejo bacteriano que cataliza la fijación biológica de nitrógeno. El complejo de la nitrogenasa está formado por el heterotetrámero codificado por los genes *nifD* and *nifK*, y la dinitrógeno reductasa codificada por el gen *nifH*, la cual es capaz de reducir N_2 a NH_3 (Kim *et al.*, 1994). La cuantificación de los niveles de expresión del gen *nifH* se considera una buena estimación de la capacidad de los rizobios de fijar nitrógeno,

a la vez que es un biomarcador ampliamente usado para estudiar tanto la ecología como la evolución de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Raymond *et al.*, 2004).

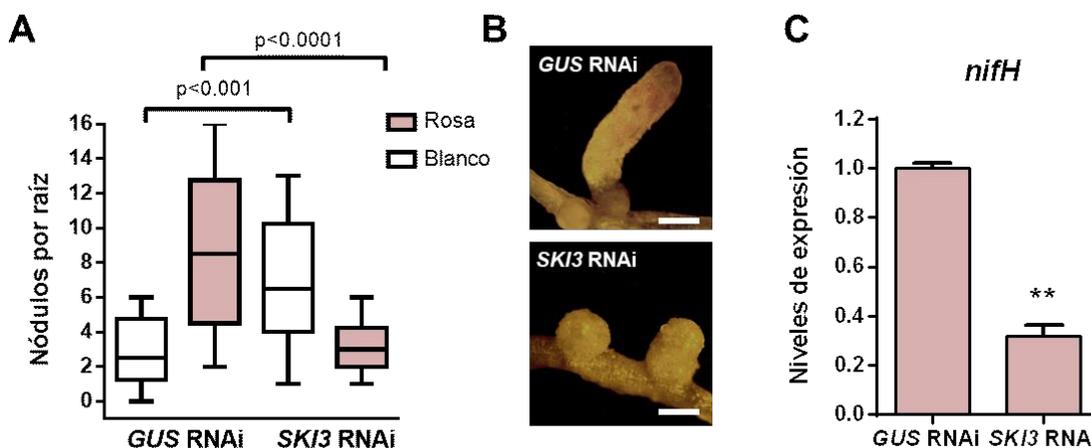


Figura 27. El silenciamiento de *SKI3* afecta el desarrollo y la maduración de los nódulos y la expresión del gen bacteriano *nifH* **A.** Número de nódulos blancos y rosados formados a los 28 dpi en plantas transformadas con *SKI3* RNAi o con el control *GUS* RNAi. Los *boxplots* representan la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior del *box*), y el 75 (extremo superior del *box*). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los datos corresponden a la media \pm el SEM. Los valores de *p* indican diferencias significativas respecto al control en un t-test no apareado de dos colas. El resultado es representativo de 3 réplicas biológicas. Al menos 65 nódulos fueron analizados en cada condición en cada una de las 3 réplicas. **B.** Fotos ilustrando la morfología de los nódulos. Mientras que los nódulos formados en raíces *GUS* RNAi son alargados y bien desarrollados los nódulos *SKI3* RNAi son esféricos y más pequeños. La barra de escala corresponde a 0,5 mm. **C.** Niveles relativos de transcripto del gen *nifH* de *S. meliloti*, utilizado como indicador de la capacidad de fijar nitrógeno de los rizobios. Se realizaron experimentos de RT-qPCR a partir de RNA extraído de nódulos de 28 dpi generados en raíces *SKI3* RNAi o *GUS* RNAi, utilizando los *primers* NifH F y NifH R. Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un t-test (**, $p < 0,01$). Los datos fueron normalizados respecto a los valores de expresión de *ntrB*, utilizando los *primers* ntrB F y ntrB, y expresados en relación a plantas *GUS* RNAi, al que se asignó un valor de 1.

3. *SUPERKILLER3* no es requerida para la infección por rizobios

Teniendo en cuenta que las raíces con niveles disminuidos de *SKI3* mostraron una menor cantidad de nódulos y un menor contenido de bacterias, nos preguntamos si la causa de este fenotipo podría estar asociada a fallas en el proceso de infección bacteriana. Para determinar esto, plantas compuestas de *M. truncatula* fueron inoculadas con la cepa de *S.*

meliloti 1021 que expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente roja (RFP). De esta manera es posible visualizar los eventos de infección mediante microscopía de fluorescencia. La cuantificación de la densidad de hilos de infección muestra que las raíces *SKI3* RNAi y *SKI3* RNAi2 forman igual cantidad de hilos de infección que las raíces control *GUS* RNAi (Figura 28A). Los hilos de infección formados se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su progresión: ITs que solamente han crecido dentro del pelo radical, ITs que penetran otras células de la epidermis e ITs que alcanzan el córtex de la raíz. Los resultados no revelaron diferencias significativas en el grado de progresión de los hilos de infección entre plantas control y las plantas que expresan las construcciones *SKI3* RNAi o *SKI3* RNAi2 (Figura 28B). Estos resultados sugieren que *SKI3* no es requerido para la iniciación de los eventos de infección ni para la progresión de los hilos de infección hacia las células corticales.

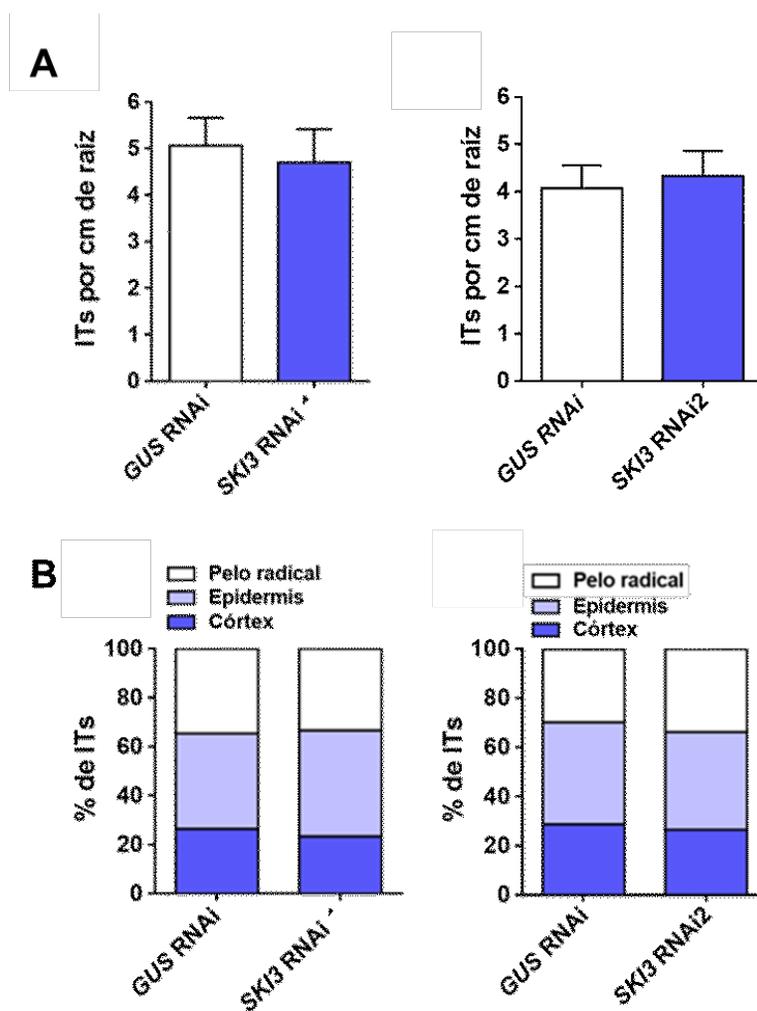


Figura 28. El silenciamiento de *SKI3* no afecta la iniciación ni la progresión de los eventos de infección.
A. Cuantificación de hilos de infección (ITs) por centímetro de raíz en las raíces *SKI3* RNAi, *SKI3* RNAi2 o *GUS* RNAi a 7 los dpi con *S. meliloti* con que expresa RFP mediante un microscopio de fluorescencia. Los datos corresponden a la media \pm SEM **B.** Porcentaje de eventos de infección que se encuentran detenidos en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces *SKI3* RNAi, *SKI3* RNAi2 o *GUS* RNAi a los 7 dpi. Los datos en A y B son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 35 raíces por cada condición y ensayo.

4. *SUPERKILLER3* es necesario para la supervivencia de las bacterias dentro de los nódulos.

La morfología y los niveles de expresión del gen *nifH* de *S. meliloti* de los nódulos desarrollados en las plantas *SKI3* RNAi sugieren que podrían no ser funcionales en

términos de desarrollo y actividad de fijación de nitrógeno, por lo que se decidió evaluar la viabilidad de las bacterias dentro de los nódulos formados en las raíces *SKI3* RNAi y *GUS* RNAi. Para esto se utilizó la tinción de células usando el colorante fluorescente SYTO9 (verde), que tiñe las bacterias vivas, y el yoduro de propidio (rojo), que permite visualizar las células que exhiben daño en la membrana, así como también los núcleos intactos de células en activa división celular. En las raíces *GUS* RNAi, la gran mayoría de las células del nódulo de la zona de fijación presentaron fluorescencia verde pero no roja, indicando que las bacterias están vivas (Figura 29). Por el contrario, en los nódulos formados en las plantas *SKI3* RNAi, la mayoría de las células bacterianas se tiñeron con yoduro de propidio, indicando que sus membranas están dañadas y por lo tanto no son viables. En vista de este resultado, se analizó la integridad de los simbiosomas y la diferenciación de los bacteroides mediante microscopía electrónica de transmisión. Estos ensayos revelaron que las células ubicadas en las zonas intermedia (II) y de fijación de nitrógeno (III) de los nódulos se encontraban ocupadas por bacteroides diferenciados tanto en los nódulos de *GUS* RNAi como en los *SKI3* RNAi; sin embargo, los simbiosomas de los nódulos de plantas *SKI3* RNAi presentaron un espacio peribacteroide reducido en comparación con el de los nódulos de plantas *GUS* RNAi. Este espacio es la interfase entre la membrana peribacteroide (formada por la membrana plasmática de la célula vegetal durante la endocitosis de la bacteria) y los bacteroides. Además, las células del simbiosoma presentes en los nódulos de plantas *SKI3* RNAi contienen estructuras rodeadas de membrana que se asemejan a vacuolas, las cuales estaban ausentes en las células simbióticas *GUS* RNAi (Figura 29, último panel a la derecha). El conjunto de estos resultados sugiere que *SKI3* sería prescindible para la diferenciación de las bacterias, pero requerido para la formación normal de los simbiosomas y la supervivencia de las bacterias dentro de los nódulos.

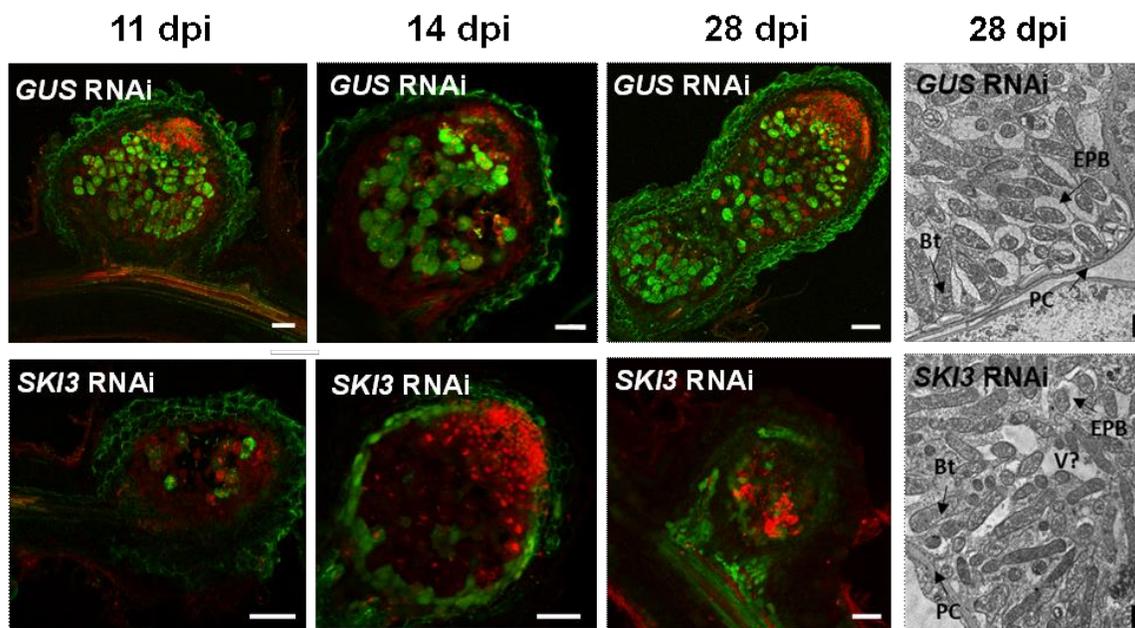


Figura 29. SKI3 es necesaria para la supervivencia de las bacterias dentro del nódulo. Paneles de la izquierda: tinción de nódulos desarrollados en plantas *GUS RNAi* y *SKI3 RNAi* a 11, 14 y 28 dpi con *S. meliloti*. Los nódulos se incubaron con SYTO9 (verde), el cual tiñe las bacterias vivas, y con ioduro de propidio (rojo), el cual se incorpora en las células que presentan daño en la membrana plasmática, así como también tiñe los núcleos de las células meristemáticas. Barra = 50 μm. Paneles de la derecha: Microscopía electrónica de transmisión de cortes de nódulos de 28 dpi, donde se evidencia una reducción del espacio peribacteroide (EPB). Bt, bacteroide. PC, pared celular. V, vacuola. Barra = 2 μm.

5. El silenciamiento de *SKI3* altera la expresión de los genes de nodulación *ENOD40* y *ERN1* en respuesta a *S. meliloti*

Para obtener información sobre los eventos moleculares afectados por el silenciamiento de *SKI3*, se analizó la expresión de diferentes genes marcadores de la nodulación temprana en raíces de plantas *SKI3 RNAi* y *GUS RNAi* inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control al cabo de 48 hpi. Los genes seleccionados fueron: *NF-YA1* (*Nuclear Factor Y-A1*, Soyano et al., 2013), *NIN* (*Nodule Inception*, Marsh et al., 2007), *CRE1* (*Cytokinin Receptor1*, Gonzalez-Rizzo et al., 2006) y *ENOD40* (*Early Nodulation gene40*, Crespi et al., 1994; Charon et al., 1997). Los experimentos de RT-qPCR revelaron que la inducción de *ENOD40* y *ERN1* en respuesta a los rizobios se redujo en gran medida en las raíces de *SKI3 RNAi* en comparación con las raíces *GUS RNAi*, mientras que la inducción de *NIN* y *NF-YA1* no se vio afectada (Figura 30). Estos resultados indican que los niveles de dos genes marcadores de nodulación temprana asociados a la activación de las divisiones de

células corticales requeridas para el inicio de los nódulos se ven significativamente alterados por el silenciamiento de un componente del complejo SKI durante el proceso simbiótico.

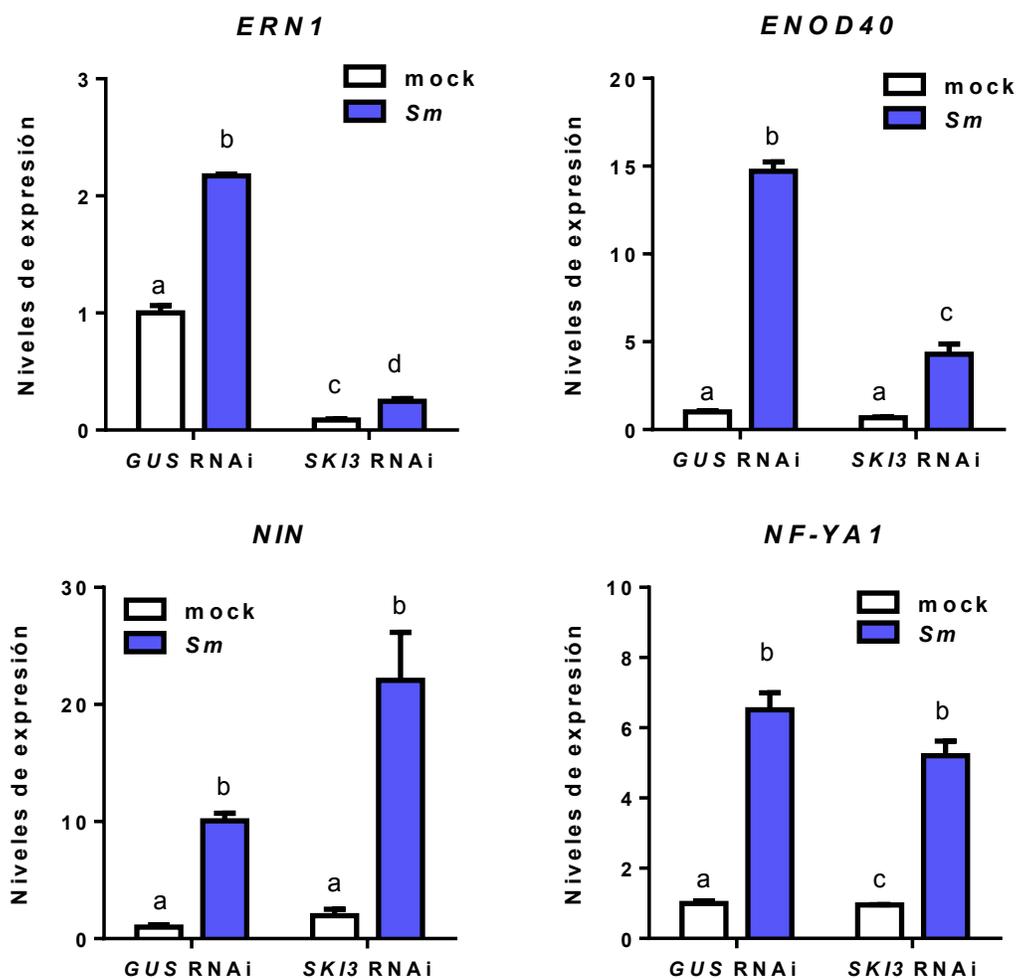


Figura 30. Expresión de genes marcadores de nodulación temprana en las raíces *GUS RNAi* y *SKI3 RNAi*. Niveles de transcritpo de los genes de nodulación temprana *NIN*, *NF-YA1*, *ERN1* y *ENOD40* en raíces *GUS RNAi* y *SKI3 RNAi* inoculadas con *S. meliloti* (*Sm*) o con agua como control negativo (*mock*) a las 48 hpi. Los valores de expresión se determinaron mediante RT-qPCR utilizando los pares de *primers* ERN1 F/ERN1 R, ENOD40 F/ENOD40 R, NIN F/NIN R y NF-YA1 F/NF-YA1 R. Los niveles de los transcritpos fueron normalizados con los niveles del transcritpo *HIS3L* y se expresaron en relación con la muestra *GUS RNAi mock*. Cada barra representa la media \pm SEM de dos réplicas biológicas. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un t- test no apareado de dos colas con $p < 0,05$.

6. El silenciamiento de *SKI3* genera cambios en el clivaje dirigido por miRNAs y en la degradación de mRNAs en respuesta a *S. meliloti*

Como fue mencionado en la introducción, estudios recientes han demostrado que el complejo SKI de plantas actúa como un supresor del silenciamiento génico postranscripcional endógeno (PTGS) (Zhang *et al.*, 2015; Yu *et al.* 2015), afectando también la transitividad de los miRNAs, es decir, la producción de siRNAs secundarios derivados de la escisión endonucleolítica del *target* del miRNA (Branscheid *et al.* 2015). Un estudio posterior reveló que, en ausencia de un complejo SKI funcional, los transcriptos generados a partir del gen *CER7* de *A. thaliana* que se acumulan en el citoplasma se desvían a la ruta de degradación de 5' a 3' (Zhao and Kunst., 2016). Para evaluar si el silenciamiento de *SKI3* en las raíces de *M. truncatula* altera la degradación de mRNAs en respuesta a *S. meliloti*, se realizó un mapeo de los RNAs clivados que no presentan *cap* en el extremo 5' (GMUCT 2.0, por *genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts*) en las raíces *GUS* RNAi y *SKI3* RNAi inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control a las de 48 hpi. Esta estrategia permite identificar específicamente los productos de clivaje endonucleolítico mediado por miRNAs o siRNA y los mRNAs sin *cap* en el extremo 5', ya que la técnica se basa en la ligación de un adaptador de RNA a los extremos 5' que poseen un monofosfato 5' (5'P) libre (Willmann *et al.*, 2014). Los datos generados mediante la secuenciación de las bibliotecas generadas a partir de GMUCT 2.0 (GMUCT-seq) se analizaron utilizando el programa HOMER, que identifica los picos correspondientes a los extremos 5' acumulados diferencialmente. Se realizaron las comparaciones de picos diferenciales de las raíces *GUS* RNAi *mock versus* (vs) *GUS* RNAi Sm, *SKI3* RNAi *mock vs* *SKI3* RNAi Sm, *GUS* RNAi *mock vs* *SKI3* RNAi *mock* y *GUS* RNAi Sm vs *SKI3* RNAi Sm (Figura 31A, izquierda). Se identificaron en total 787 picos con extremos 5'P acumulados diferencialmente (Tabla Suplementaria 8). Cuando se calculó la relación entre los valores de las muestras infectadas frente al control *mock* en las plantas *SKI3* RNAi y se lo relativizó por el mismo parámetro en la muestra *GUS* RNAi se identificaron 261 picos correspondientes a extremos 5' que aumentan y 161 que disminuyen (Figura 31A, derecha). Estos picos corresponden a transcriptos cuya degradación se modifica en respuesta a la infección en forma condicionada por la presencia de SKI3. El análisis de las categorías funcionales basado en *GO* seguido de una inspección

manual de los genes individuales indicó un enriquecimiento en las categorías transporte y metabolismo del DNA/RNA (Figura 31B). Dentro de esta última categoría se destacan los RNAs que codifican para la proteína 4SNc *tudor domain* (involucrada en la regulación de la expresión génica, regulación de small RNAs y epigenética), las proteínas *polypyrimidine tract-binding* y *Dead-box ATP dependent RNA helicase* (involucradas en el *splicing* alternativo de los pre-mRNAs) y la proteína polyA-binding (Figura 31C), cuyo rol está relacionado con la biogénesis, la estabilidad y la traducción de los mRNAs. Dentro de la categoría transporte, la proteína EXO70 (involucrada en la exocitosis y el transporte de proteínas) (Figura 31C), la GTPasa RAB (relacionada con el tráfico de vesículas), una sinaptobrevina (que cumple funciones en el transporte mediado por vesículas) y, por último, la proteína de transporte SEC12p. Estos resultados y ejemplos presentados muestran cómo el análisis de la dinámica de los procesos de degradación de mRNAs puede contribuir a comprender la reprogramación génica durante el proceso simbiótico.

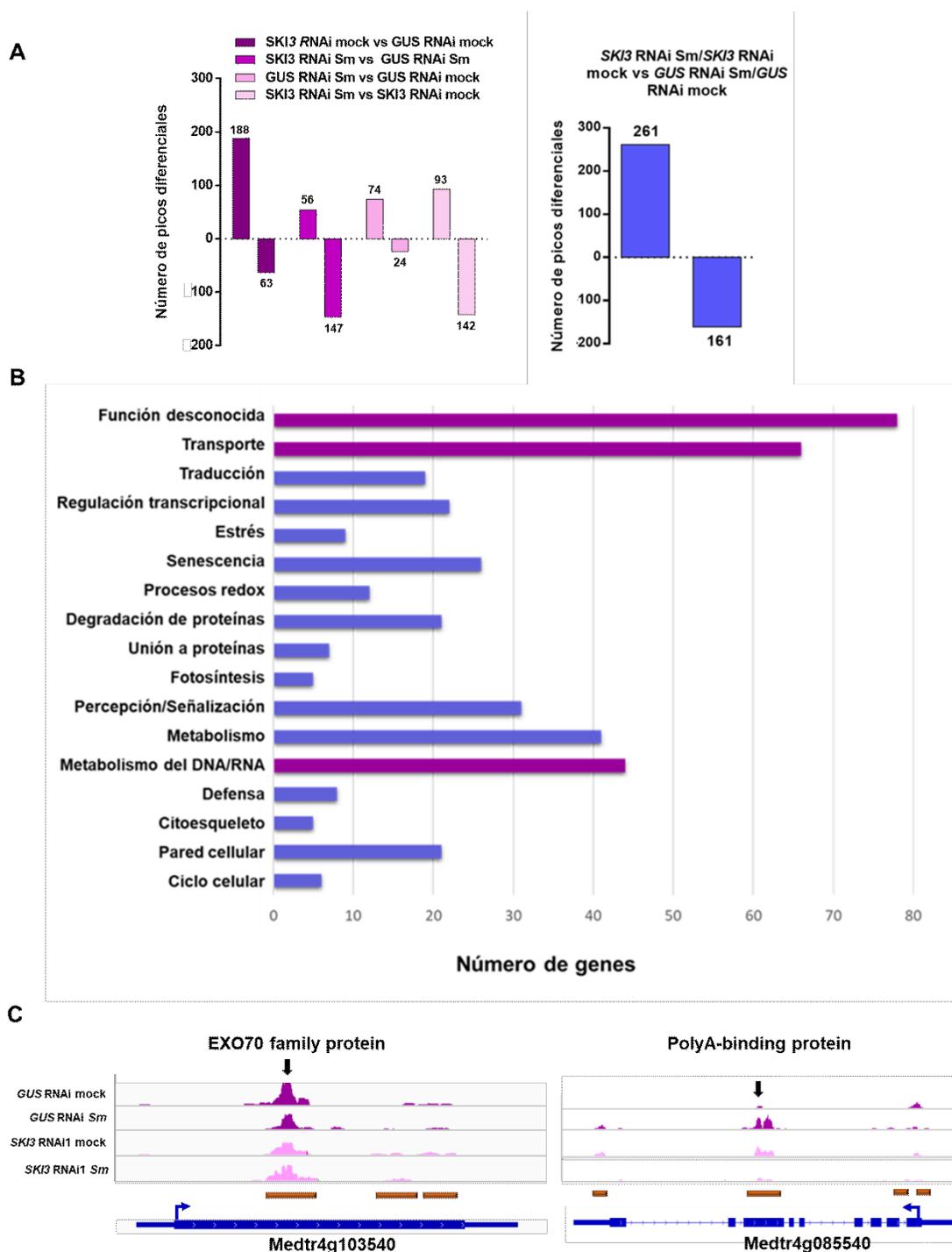


Figura 31. Picos GMUCT diferenciales en muestras de RNA de raíces *GUS* RNAi y *SKI3* RNAi. A. Número de picos correspondientes a extremos 5' que disminuyen en cada una de las comparaciones indicadas. **B.** Clasificación funcional de los genes con picos GMUCT acumulados diferencialmente en la comparación *SKI3* RNAi Sm/*SKI3* RNAi mock vs. *GUS* RNAi Sm/*GUS* RNAi mock. Cada categoría se muestra en azul, con excepción de las tres mayoritarias, transporte y metabolismo de DNA/RNA y proteínas de función desconocida, que se muestran en púrpura. **C.** Distribución de las lecturas correspondientes a los

extremos 5' detectados por GMUCT 2.0 de los genes EXO70 family protein y Poly-A binding protein tomados como ejemplo. Las muestras *GUS* RNAi se muestran en púrpura y las muestras *SKI3* RNAi en rosa. Las flechas negras señalan los picos GMUCT 2.0 acumulados diferencialmente. Los rectángulos naranjas al pie de cada representación indican el sitio de acumulación de lecturas 5' (picos). Los modelos génicos están esquematizados en la parte inferior. La flecha azul representa el sitio canónico de inicio de la traducción.

Para investigar si el clivaje mediado por miRNAs se ve afectado por el silenciamiento de *SKI3*, se predijeron los sitios *target* de los miRNAs conservados de *M. truncatula* usando el *software* MiRanda y luego se determinó si había evidencia de escisión en estos sitios utilizando los datos de GMUCT 2.0. El análisis confirmó que 44 RNAs *targets* de miRNAs conservados contienen lecturas 5' en el sitio diana previsto (Tabla Suplementaria 9). La comparación de los picos 5'P identificados por el programa HOMER y los sitios de unión de miRNAs conservados mostró que existen dos mRNAs con niveles reducidos de lecturas 5'P en las muestras *SKI3* RNAi en comparación con *GUS* RNAi (Figura 32A).

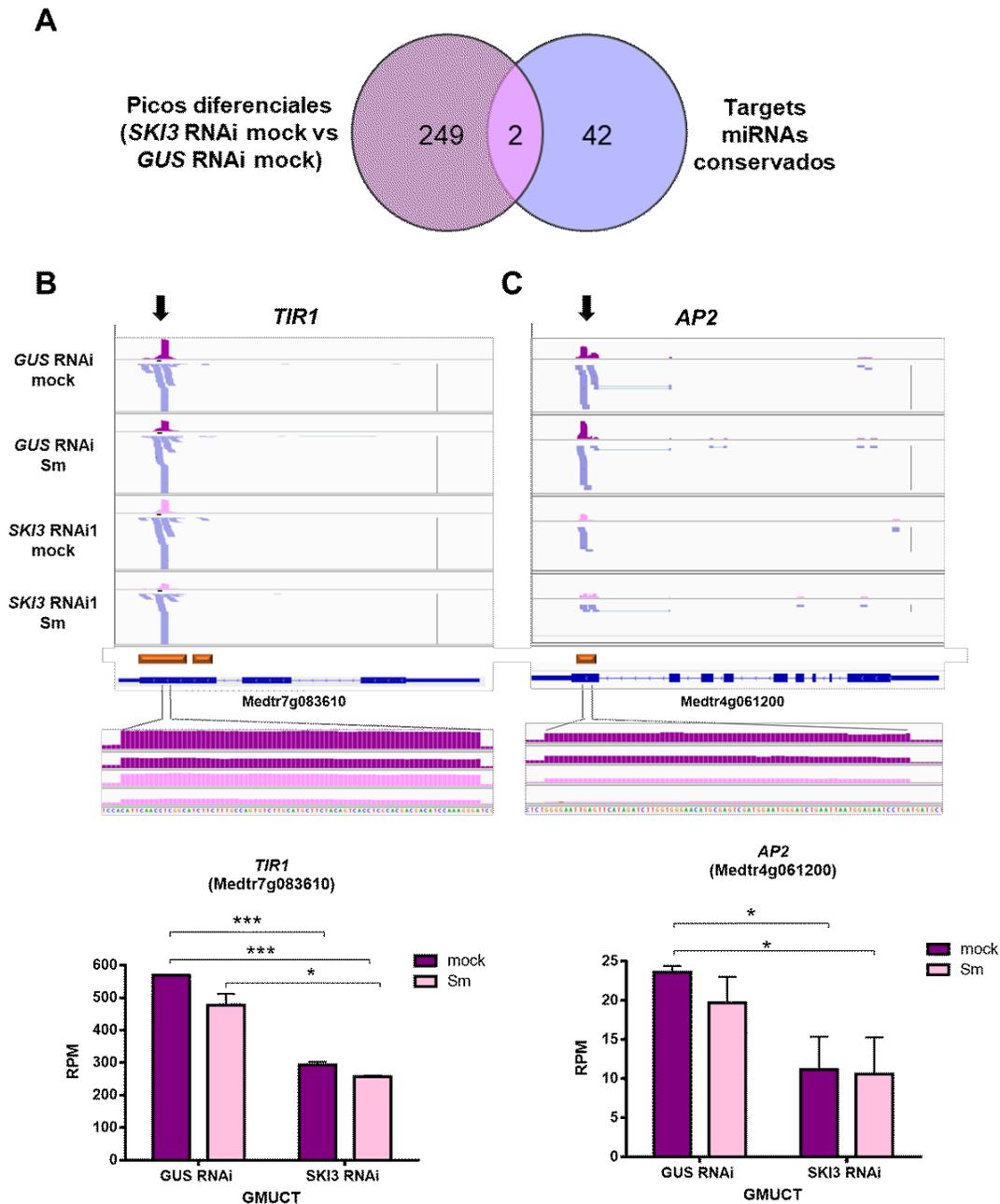


Figura 32. Correlación entre picos 5' identificados mediante GMUCT-seq y sitios de clivaje de miRNAs. **A.** Diagramas de Venn que muestran la superposición entre picos correspondientes a extremos 5' identificados mediante GCMUT-seq y sitios de corte de miRNA conservados en *M. truncatula*. **B** y **C.** Distribución de las lecturas de los extremos 5' de los transcritos *TIR1* (**B**) y *AP2* (**C**). Las muestras *GUS* RNAi se muestran en púrpura y las muestras *SKI3* RNAi en rosa. Las flechas negras indican los sitios de unión de miR393 (**B**) y miR172 (**C**). Los rectángulos naranjas al pie de cada representación indican el sitio de acumulación de lecturas 5' (picos). Los modelos genéticos están esquematizados en la parte inferior. Debajo de esta se muestra una amplificación de las lecturas en los sitios de corte de los miRNAs. Panel inferior: cantidad de lecturas obtenidas en los experimentos de GMUCT-seq expresada como lecturas por millón de lecturas (RPM, reads per million reads) del extremo 5' en raíces *SKI3* RNAi y *GUS* RNAi inoculadas con

S. meliloti (Sm) o con agua (*mock*). Las muestras de *GUS* RNAi se muestran en púrpura y las muestras de *SKI3* RNAi se muestran en rosa. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un t-test con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,01$ (***)).

Uno de los mRNAs, el cual es *target* de miR393, codifica una Transport Inhibitor Response 1 (TIR1) protein (Figura 32B), mientras que el segundo codifica un factor de transcripción de tipo AP2 que responde a etileno y es *target* de miR172 (Figura 32C). En la leguminosa soja (*Glicine max*), los niveles de miR172 aumentan durante el proceso de infección. Este miRNA es necesario para el proceso de infección y el posterior desarrollo del nódulo, por lo que es considerado un regulador positivo de la nodulación (Wang *et al.*, 2014). En soja se reportó que miR172 cliva a un factor de transcripción de tipo AP2, designado como *NNC1* (*Nodule Number Control 1*) (Wang *et al.*, 2014). La proteína NNC1 actúa como un represor transcripcional del gen de nodulación temprana *ENOD40* y es, por lo tanto, un regulador negativo de la formación de nódulos (Wang *et al.*, 2014). Como se mencionó en la introducción, *ENOD40* es activado en respuesta al NF y es necesario para la organogénesis del nódulo (Crespi and Galvez, 2000). El gen de tipo AP2 identificado en este estudio (Medtr4g061200) es el mejor homólogo sinténico de *G. max* *NNC1* (Figura 33A). Para evaluar si el factor de transcripción de respuesta a etileno AP2 identificado es también capaz de reprimir la expresión de *ENOD40* en raíces de *M. truncatula*, se realizó un análisis de expresión mediante RT-qPCR. Los resultados revelaron que los niveles de AP2 en estado estacionario en las raíces de *M. truncatula* que expresan la construcción *GUS* RNAi se reducen significativamente a los 2 dpi con respecto a las raíces control, mientras que no se observó una diferencia significativa en las raíces *SKI3* RNAi en respuesta a la inoculación (Figura 33B). La ausencia de represión de AP2 a los 2 dpi coincide con la falta de inducción de *ENOD40* en las raíces *SKI3* RNAi, que se describió en la sección 5 de este capítulo. La ausencia de regulación de AP2, que podría ser consecuencia de la disfuncionalidad en las vías de degradación como consecuencia del silenciamiento de *SKI3*, continúa a los 6 y 10 dpi, y contribuye a explicar la reducción del número de nódulos observados en estas raíces en comparación con las raíces *GUS* RNAi control.

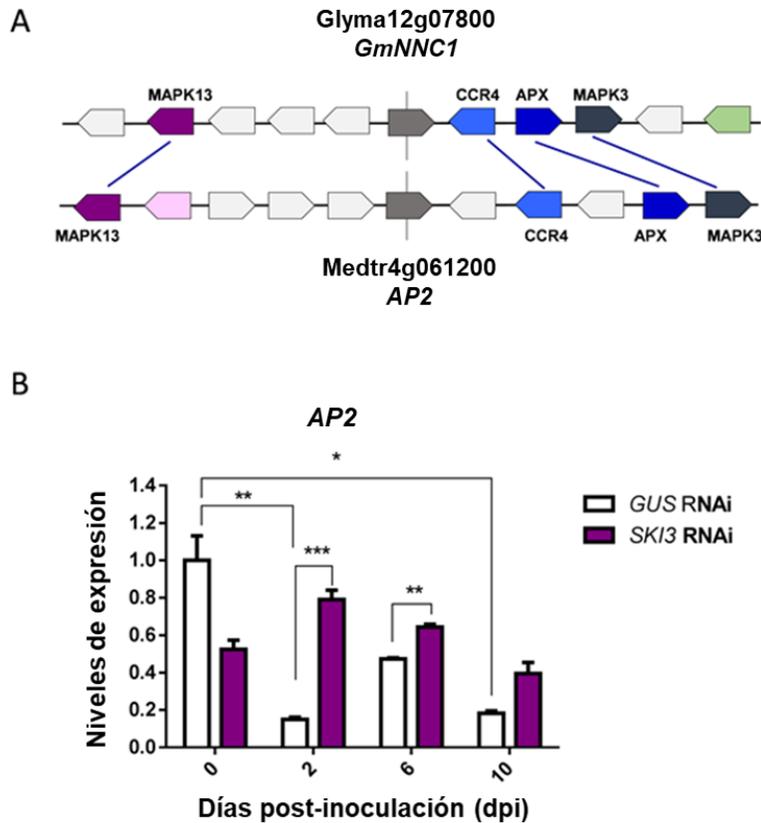


Figura 33. La represión de *AP2* en respuesta a *S. meliloti* depende de *SKI3*. **A.** Regiones sinténicas de *AP2* de *M. truncatula* y *NNC1* de *G. max*. Los genes ancla que flanquean *AP2* están conectados con líneas de colores. **B.** Niveles relativos de transcripto *AP2* en raíces *GUS* RNAi y *SKI3* RNAi inoculadas con agua (0 dpi) o con *S. meliloti* a 2, 6 y 10 dpi. Los valores de expresión se determinaron mediante RT-qPCR utilizando los *primers* *AP2* R y *AP2* F, fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L* y se expresaron en relación a la muestra *mock* a tiempo 0, a la que se le asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$) en un t-test no apareado de dos colas.

Capítulo 3

Identificación y caracterización de lncRNAs asociados a la maquinaria traduccional

1. Asociación diferencial de lncRNAs a la maquinaria traduccional en respuesta a *S. meliloti*.

El análisis bioinformático de los datos generados a partir de TRAP-seq permitió identificar un número importante de genes y transcriptos regulados específicamente a nivel traduccional. Algunos de estos genes corresponden a regiones del genoma que no se encuentran anotadas, o que han sido anotados como codificantes de proteínas hipotéticas, pero no contienen marcos abiertos de lectura (ORFs, por *Open Reading Frames*) mayores a 100 aminoácidos, por lo que podrían representar RNAs no codificantes (ncRNAs). Con el fin de identificar los genes no codificantes de proteínas o ncRNAs, se utilizaron los algoritmos computacionales Coding Potential Calculator (CPC) (Kong et al., 2007) y Coding Potential Assesment Tool (CPAT) (Wang et al., 2013). Sólo los transcriptos que tuvieran ORFs menores a 100 aminoácidos fueron considerados en este el análisis. A su vez, aquellos RNAs con una longitud mayor a 200 nucleótidos se consideraron ncRNAs largos (lncRNAs), siguiendo los criterios aplicados previamente en *A. thaliana* (Liu et al., 2012), mientras que aquellos ncRNAs menores a 200 nucleótidos se los consideró ncRNAs pequeños (sncRNAs por *small non-coding RNAs*). Usando esta clasificación, encontramos que los GEDs a nivel traduccional se encuentran enriquecidos en lncRNAs en comparación con el transcriptoma de raíz total, así como también en comparación con los GEDs regulados a nivel transcripcional en nuestras condiciones experimentales. Así, el porcentaje de lncRNAs dentro del transcriptoma de raíz (total de los genes expresados) en nuestras condiciones experimentales fue de sólo 1,53 %, mientras que entre los GEDs en las muestras de RNA Total fue de 2% para los regulados positivamente y 9 % para aquellos regulados negativamente. En el caso de las muestras de RNA TRAP, este porcentaje escaló hasta un 15 % entre los GEDs que aumentan su asociación a la maquinaria traduccional y un 14 % entre aquellos que disminuyen (Figura 34) (Tabla Suplementaria 10). Esta tendencia también se observó para los sncRNAs en las muestras de TRAP. Con el objetivo de analizar si los 65 lncRNAs identificados como asociados diferencialmente a la maquinaria traduccional se encuentran conservados en otras especies, se realizó un BLAST contra bases de datos de lncRNAs de plantas disponibles en bibliografía (Szcześniak et al., 2016). No se encontró homología a nivel de secuencia en ninguno de los 65 casos. Este análisis refuerza la teoría de que los lncRNAs se encuentran poco conservados a nivel de

secuencia nucleotídica entre especies. Teniendo en cuenta que se ha descrito en *A. thaliana* que la asociación de los lncRNAs a la maquinaria traduccional da origen a pequeños péptidos (Bazin *et al.*, 2017), se realizó una búsqueda de pequeños ORFs (sORFs, por *small open reading frames*) presentes en los lncRNAs. Se realizó luego un BLASTp contra las bases de datos de plantas disponibles en ncbi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Este análisis reveló que la gran mayoría de los sORFs presentes en los lncRNAs que se asocian diferencialmente a la maquinaria traduccional no codifican péptidos conservados en plantas. Se compararon también estos sORFs con los datos obtenidos por Bazin *et al.*, (2017) antes mencionados y con los datos de Murphy *et al.*, (2012) de pequeños péptidos de señalización en *A. thaliana*, así como también con los datos de Bang *et al.* (2017) de péptidos secretados en *M. truncatula*. No se encontró homología en ninguno de los casos.

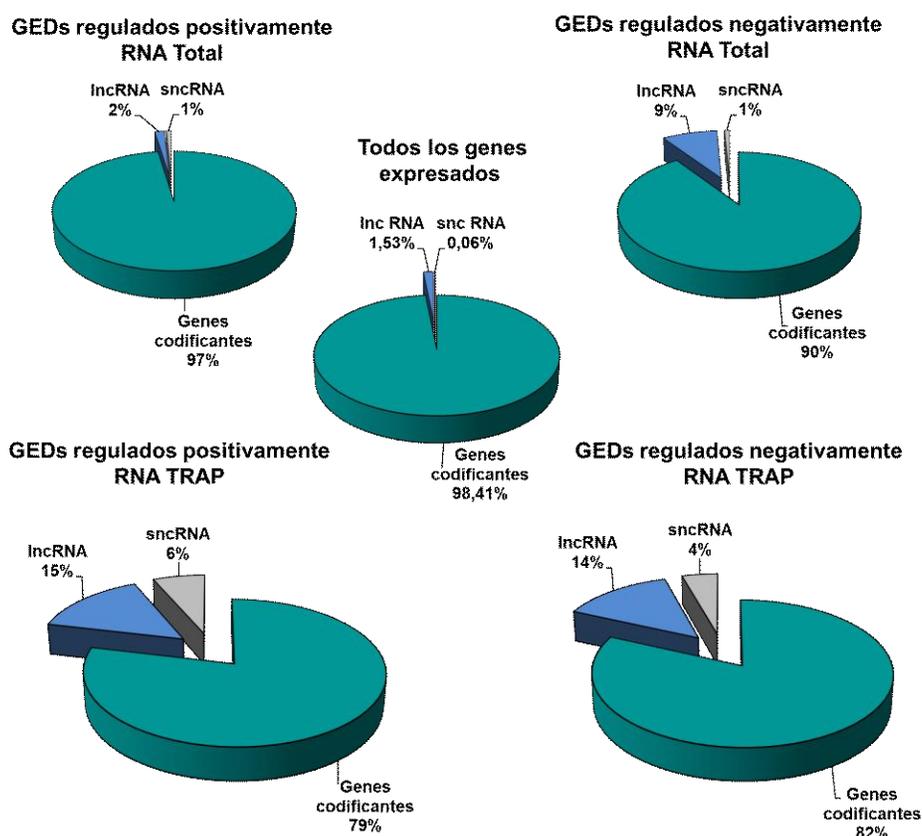


Figura 34. Asociación diferencial de lncRNAs a la maquinaria traduccional. Diagramas de torta clasificando los transcritos regulados diferencialmente en las poblaciones de RNA Total o de RNA TRAP. Los transcritos se clasificaron en RNA codificantes, sncRNAs o lncRNAs. El diagrama del centro representa

los RNA codificantes, snRNAs y lncRNAs en el total de transcriptos presentes en el transcriptoma raíz de *M. truncatula* en nuestras condiciones experimentales.

2. Los cambios en la asociación de lncRNAs a polisomas en respuesta a *S. meliloti* están influenciados por el tipo celular

Los lncRNAs identificados como GEDs en las poblaciones RNA TRAP se clasificaron según su ubicación genómica en relación con los genes que codifican proteínas, siguiendo los criterios recomendados por Ariel *et al.* (2015). Resulta oportuno mencionar que, al ser las bibliotecas bidireccionales, tanto las de RNA Total como de RNA TRAP, no fue posible identificar *cis*-NAT RNAs ni tampoco lncRNAs intrónicos, por lo que solamente se consideraron las categorías lncRNAs intergénicos (lincRNAs) y lncRNAs asociados a regiones promotoras. Los lincRNA identificados en nuestras condiciones experimentales incluyen, entre otros, a Medtr1gNC01400, Medtr4NC044596 y Medtr3NC032155. Medtr1gNC01400, el cual es transcripto a partir del *locus* Medtr1g035240 del genoma de *M. truncatula* v 4.0 (Mtv4.0) es muy abundante en el transcriptoma de raíces y aumenta su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a *S. meliloti* (Figura 35A). La anotación de Medtr1g035240 indica que su marco abierto de lectura codifica una proteína hipotética de 68 aminoácidos. La inspección en los traductomas específicos de tejido reveló que Medtr1gNC01400 se encuentra regulado positivamente en respuesta al rizobio en los traductomas de córtex y células acompañantes del floema, pero no en el traductoma de epidermis (Figura 35A y 35B). Medtr4NC044596 y Medtr3NC032155 disminuyen su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta al rizobio (Figura 35A). La inspección de los traductomas específicos de tejido mediante RT-qPCR reveló que Medtr4NC044596 se encuentra enriquecido en el traductoma de células corticales en las muestras no inoculadas, pero disminuye en todos los tejidos analizados en respuesta a la inoculación, mientras que la asociación de Medtr3NC032155 a la maquinaria traduccional disminuyó específicamente en córtex (Figura 35B). Estos resultados sugieren que la asociación de los lncRNAs a la maquinaria traduccional y su respuesta a la infección por rizobios se ve fuertemente influenciada por el contexto específico de tejido. Por otro lado, Medtr1NC011391 es un representante de la clase de lncRNAs asociados a regiones promotoras. Este lncRNA se ubica aproximadamente a 670 pb aguas arriba del sitio de

inicio de la transcripción (TSS) de Medtr1g070015, un gen que codifica un factor de transcripción de tipo AP2/ARF (Figura 35A, panel inferior). Curiosamente, en nuestros datos de RNA-seq se observó que Medtr1NC011391 disminuye su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a *S. meliloti* (Figura 35A), mientras que el transcripto Medtr1g070015 aumenta su traducción como consecuencia de la infección rizobiana. La asociación de Medtr1NC011391 a la maquinaria traduccional en muestras no inoculadas fue mayor en el córtex; sin embargo, tras la inoculación con *S. meliloti*, este lncRNA fue regulado negativamente en este tipo celular, pero positivamente en la epidermis y las células acompañantes del floema.

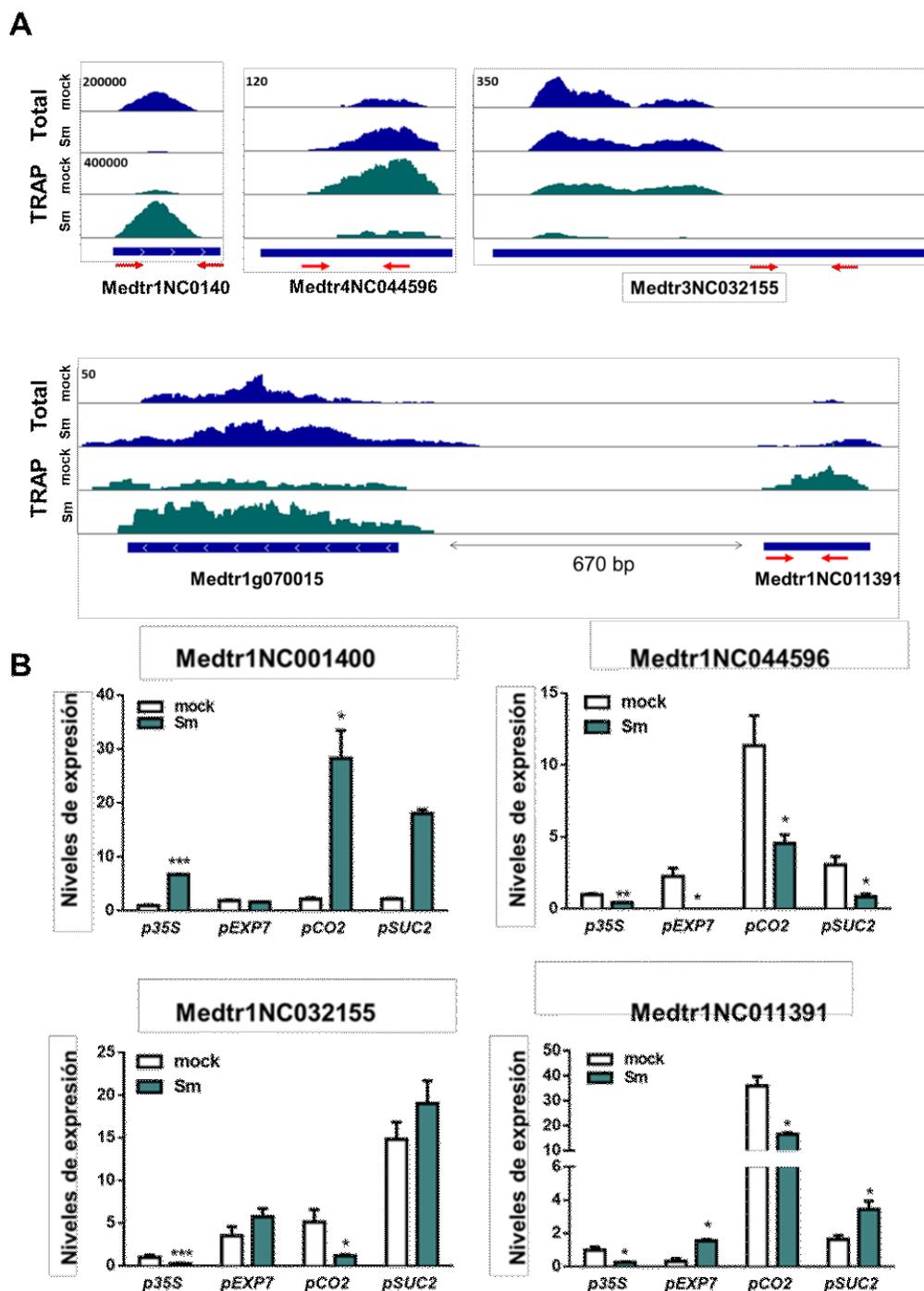


Figura 35. Asociación diferencial de lncRNAs a polisomas en respuesta a *S. meliloti*. A. Lecturas de RNA-seq de lncRNAs intergénicas (lincRNAs) seleccionados (panel superior) y de un lncRNAs asociados a promotor (panel inferior), los cuales cambian su asociación a polisomas en respuesta a la infección rizobiana. Las muestras de RNA total se muestran en azul y las muestras de RNA TRAP en verde. Los números en la parte superior izquierda indican el valor máximo de lecturas de la escala, el cual fue el mismo para todas las muestras obtenidas con excepción de Medtr1gNC01400, para el cual se muestra un valor de escala para las

muestras de RNA Total y otro para las muestras RNA TRAP. Las flechas rojas representan los *primers* (lncRNA1400 F/ lncRNA1400 R, lncRNA11391 F/ lncRNA11391 R, lncRNA44596 F/ lncRNA44596 R y PSD1 F/PSD1 R) utilizados para realizar la validación por RT-qPCR. La flecha con doble punta entre Medtr1NC011391 y Medtr1g070015 representa la distancia de 670 pares de bases entre ambos. **B.** Validación por RT-qPCR de los niveles de expresión de los lncRNAs seleccionados. Abundancia relativa de RNAs seleccionados en muestras de RNA TRAP obtenidas de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm, barras verdes) o agua (*mock*, barras blancas) que expresan la proteína FLAG-RPL18 en casi todas las células de la raíz (p35S), en células epidérmicas (pEXP7), en células corticales (pCO2) o células acompañantes del floema (pSUC2). Los valores de expresión fueron normalizados con los valores del transcrito *HIS3L* y expresados en relación a la muestra *mock* p35S. Las barras representan la media \pm SEM de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con la muestra *mock* (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$).

3. Análisis funcional del lncRNA Medtr3NC032155

3.1. Variantes de transcrito de Medtr3NC032155 y su asociación a polisomas en etapas tempranas de la interacción simbiótica

Dentro de los lncRNAs que se asocian diferencialmente a la maquinaria traduccional, se seleccionó el lincRNA Medtr3NC032155 para abordar su caracterización funcional en el contexto de la simbiosis, dado que el mismo disminuye significativamente su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, pero no presenta cambios importantes a nivel del transcriptoma. Este lincRNA fue designado *POSEIDON* por las siglas en inglés POLysome-associated Symbiotically Engaged Intergenic Down-regulated long Non-coding RNA. El alineamiento de las lecturas de RNA-seq obtenidas en el presente estudio al genoma de *M. truncatula* utilizando el programa TopHat 2 indicó que *POSEIDON* (de acá en adelante *PSD*) tendría un tamaño aproximado de 1351 pb (Figura 36A). Sin embargo, una inspección detallada de los datos generados mediante RNA Total y TRAP-seq en la región correspondiente al transcrito *PSD* sugiere que este *locus* podría generar al menos dos variantes alternativas de transcrito, ya que la densidad de lecturas varía a lo largo de la secuencia (Figura 36A). *PSD* no se encuentra anotado en la versión v4.0 del genoma de *M. truncatula*, pero sí en la recientemente publicada v5.0 (Pecrix *et al*, 2018). En esta versión del genoma, *PSD* se identifica como un ncRNA de 848 pb. La ubicación respecto del modelo génico de 1351 pb obtenido en este estudio se esquematiza

en la Figura 36A. Para confirmar el modelo génico de *PSD* se diseñaron *primers* complementarios a los extremos 3' y 5' del transcrito de 1351 pb. Se obtuvo una banda del tamaño esperado utilizando los *primers* OXPSD F y OXPSD R (Flechas verdes, Figura 36A) cuando se utilizó gDNA como molde, pero no fue posible la amplificación a partir de cDNA obtenido a partir de RNA Total, RNA TRAP o muestras de RNA de raíz total, tanto *mock*, como de diferentes tiempos post inoculación (Figura 36B, set de *primers* 1). Lo mismo ocurrió al amplificar utilizando el set de *primers* 2, donde se combinaron PSD2 F (Ubicado 14 pb río debajo de OXPSD F, Flecha amarilla, Figura 36A) y OXPSD R (Figura 36B). Al utilizar el par de *primers* N1 F (Flecha roja, Figura 36A), ubicado 47 pb río debajo de OXPSD F, y PSD1 R (Flecha negra, Figura 36A), ubicado a 190 pb de OXPSD R, se obtuvo una banda del tamaño esperado en la amplificación a partir de cDNA. El fragmento amplificado fue de 1115 pb (Figura 36B, set de *primers* 3). Para estudiar la presencia de otra/s posible/s variante/s se realizó un ensayo de 3' RACE (3' *rapid amplification of cDNA ends*, Invitrogen) utilizando el *primer* específico para *PSD*, PSD2 F (Flecha verde, Figura 36A) y el *primer universal amplification primer* (UAP), provisto con el *kit*. De esta amplificación se obtuvo sólo un fragmento de aproximadamente 450 pb (Figura 36C). Este ensayo nos permitió entonces identificar una variante corta de *PSD*. Si bien se utilizaron diferentes *primers* para detectar la isoforma *PSD1*, esta no pudo ser detectada mediante el ensayo de 3' RACE, posiblemente debido a su baja expresión con respecto a la isoforma corta.

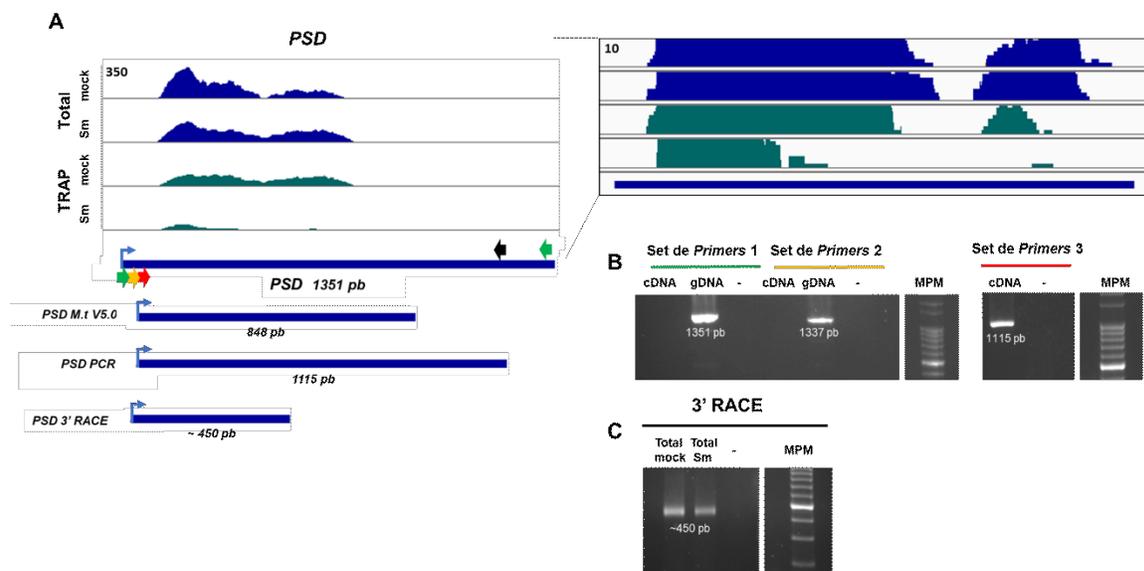


Figura 36. Posibles RNAs generados a partir del locus *PSD*. **A.** Lecturas de RNA-seq de *PSD*. Las muestras de RNA total se muestran en azul y las muestras de RNA TRAP en verde. El número en la parte superior izquierda indica el valor máximo de lecturas de la escala, el cual fue el mismo para todas las muestras obtenidas. El modelo génico de 1351 pb generado a partir de las lecturas de RNA-seq está esquematizado en la parte inferior. Debajo se esquematizan el RNA de *PSD* predicho en el sitio genómico de *M. truncatula* V5.0 (*PSD M.t.* V5.0), y los fragmentos correspondientes a la amplificación por PCR utilizando los *primers* PSD2 F y PSD1 R (*PSD PCR*) y a la amplificación mediante 3' RACE (*PSD 3' RACE*). La flecha azul indica el sentido de la transcripción. Las flechas verdes, amarilla y roja representan los *primers* usados para amplificar *PSD*. El cuadro de la derecha muestra las lecturas de RNA-seq a una escala 35 veces mayor para visualizar la relación entre el número de lecturas de la región 5' respecto a la 3'. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR del transcripto *PSD* a partir de gDNA o cDNA obtenido a partir de la muestra Total Sm utilizando el set de *primers* 1 (OXPSD F/OXPSD1 R, flechas verdes en A), el set de *primers* 2 (PSD2 F, flecha amarilla en A/OXPSD R, flecha verde en A) o el set de *primers* 3 (N1 F, flecha roja en A/ PSD1 R, flecha negra en A). El tamaño de los fragmentos amplificados corresponde a 1351 pb para el *primer set* 1, 1337 para el *primer set* 2, y 1115 pb para el *primer set* 3. Las calles de la derecha corresponden al marcador de peso molecular de 100 pares de bases (MPM). **C.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación del 3' RACE para el transcripto *PSD* utilizando como molde muestras de raíces Total *mock* o Sm. Se utilizaron el *primer* específico PSD2 F (flecha verde en A) y el *universal amplification primer* (UAP). La calle de la derecha corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Se realizaron 35 ciclos de amplificación en todos los casos.

3.2. Generación de construcciones para el silenciamiento de *PSD*

Para evaluar si el lncRNA *PSD* está involucrado en la simbiosis fijadora de nitrógeno, se decidió utilizar una estrategia de silenciamiento postranscripcional mediado por RNAi, semejante a lo descrito en el Capítulo 2. Para realizar el silenciamiento postranscripcional de *PSD* se seleccionaron dos regiones diferentes del transcripto. La primera corresponde a

un fragmento de 176 pb ubicado hacia el 3', mientras que la segunda corresponde a un fragmento de 161 pb ubicado hacia el 5' del transcripto (Figura 37A). La secuencia de ambos fragmentos fue utilizada en una búsqueda por homología de secuencia usando BLAST contra la base de datos genómica de *M. truncatula*, y sólo mostraron similitud con las secuencias a partir de las cuales se seleccionaron, sugiriendo que son secuencias específicas. Estas secuencias fueron amplificadas utilizando los pares de *primers* PSD1 F/PSD1 R y PSD2 F/PSD2 R, respectivamente (Figura 37A) y luego clonadas como repeticiones invertidas en el vector pK7GWIWG2D(II) bajo el control del promotor p35S, generando dos construcciones denominadas PSD RNAi1 y PSD RNAi2. El análisis por RT-qPCR de los niveles de *PSD* utilizando los *primers* PSD2 F y PSD2 R a partir de raíces transformadas con *PSD* RNAi1 mostró una reducción del 59 % en los niveles de transcripto de *PSD* respecto a raíces que fueron transformadas con la construcción control *GUS* RNAi, que contiene un fragmento del gen *uidA* (Figura 37B). Desafortunadamente, los niveles de silenciamiento de *PSD* a partir de raíces transformadas con *PSD* RNAi2 no pudieron ser analizados al momento de entrega de esta Tesis.

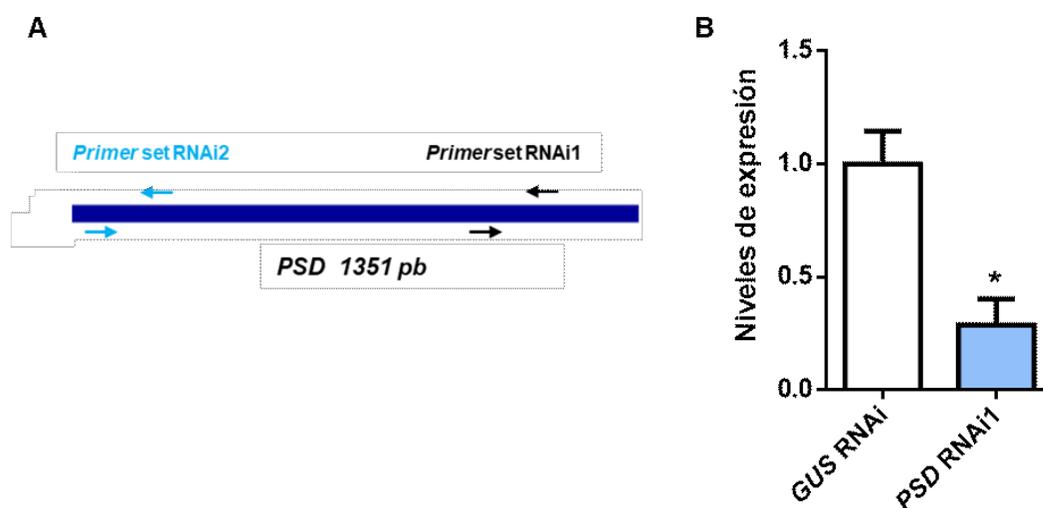


Figura 37. Silenciamiento postranscripcional de *PSD*. A. Esquema de la construcción *PSD* y la posición de los *primers* usados para generar las construcciones *PSD* RNAi1 (Flechas negras) y *PSD* RNAi2 (Flechas celestes). B. Niveles de expresión relativa de *PSD* en plantas transformadas con *PSD* RNAi1 usando *GUS* RNAi como control. Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un t-test con $p < 0,05$ (*). Los datos fueron normalizados respecto a los valores de expresión de *HIS3L* y expresados en relación a *GUS* RNAi. El resultado es representativo de 3 réplicas biológicas.

3.3. *PSD* es requerido para la organogénesis del nódulo

Con el objetivo de determinar si *PSD* es requerido para el establecimiento de la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno, se inocularon raíces que expresan las construcciones *PSD* RNAi1, *PSD* RNAi2 o *GUS* RNAi con *S. meliloti*, y se cuantificó el número de nódulos por raíz a los 7, 10, 15 y 21 dpi. La expresión de *PSD* RNAi1 causó una reducción significativa en el número de nódulos formados por *S. meliloti* a tiempos tempranos (Figura 38A). Las cinéticas de nodulación mostraron que las raíces con niveles disminuidos de *PSD* por acción del *PSD* RNAi1 presentan una reducción significativa en el número de nódulos formados a 7 y 10 días luego de la inoculación (87% y 51% de reducción, respectivamente) respecto a las raíces control (Figura 38A). A tiempos más tardíos (15 y 21 dpi), la reducción en el número de nódulos se mantuvo (42% y 45% de reducción, respectivamente), pero no fue estadísticamente significativa. Sorpresivamente, las raíces transformadas con la construcción *PSD* RNAi2 presentaron un aumento significativo en el número de nódulos formados a todos los tiempos analizados (117%, 81%, 58% y 45% de aumento, respectivamente) respecto a las raíces control (Figura 38B).

Con el fin de determinar si el silenciamiento de *PSD* afecta el desarrollo de los nódulos, se cuantificó el tamaño de los nódulos formados en las raíces *PSD* RNAi1, *PSD* RNAi2 o *GUS* RNAi a los 21 dpi. Los nódulos formados en raíces que expresan la construcción *PSD* RNAi1 a este tiempo mostraron una reducción leve, pero significativa de su tamaño respecto al control *GUS* RNAi (Figura 38C); sin embargo, no se encontraron diferencias en la morfología de estos nódulos, ya que aquellos formados en las raíces *PSD* RNAi1 fueron rosados y cilíndricos, al igual que los formados en las raíces *GUS* RNAi. Por otra parte, los nódulos formados en raíces que expresan la construcción *PSD* RNAi 2 mostraron un leve aumento de su tamaño respecto al control *GUS* RNAi, pero este aumento no fue significativo estadísticamente (Figura 38D). Si bien los nódulos formados en las raíces *PSD* RNAi2 también fueron rosados y cilíndricos, llamativamente se encontraron agrupados en *clusters* a lo largo de la raíz (Figura 38E). El 40 % de las raíces con niveles disminuidos de *PSD* por la acción de *PSD* RNAi2 presentaron al menos un *cluster* de nódulos, mientras que solamente el 14 % de las raíces de las plantas *GUS* RNAi presentaron un evento de este tipo. El análisis de los resultados sugiere que *PSD* estaría involucrado en

la regulación del número y la distribución espacial de los nódulos en las raíces de *M. truncatula*

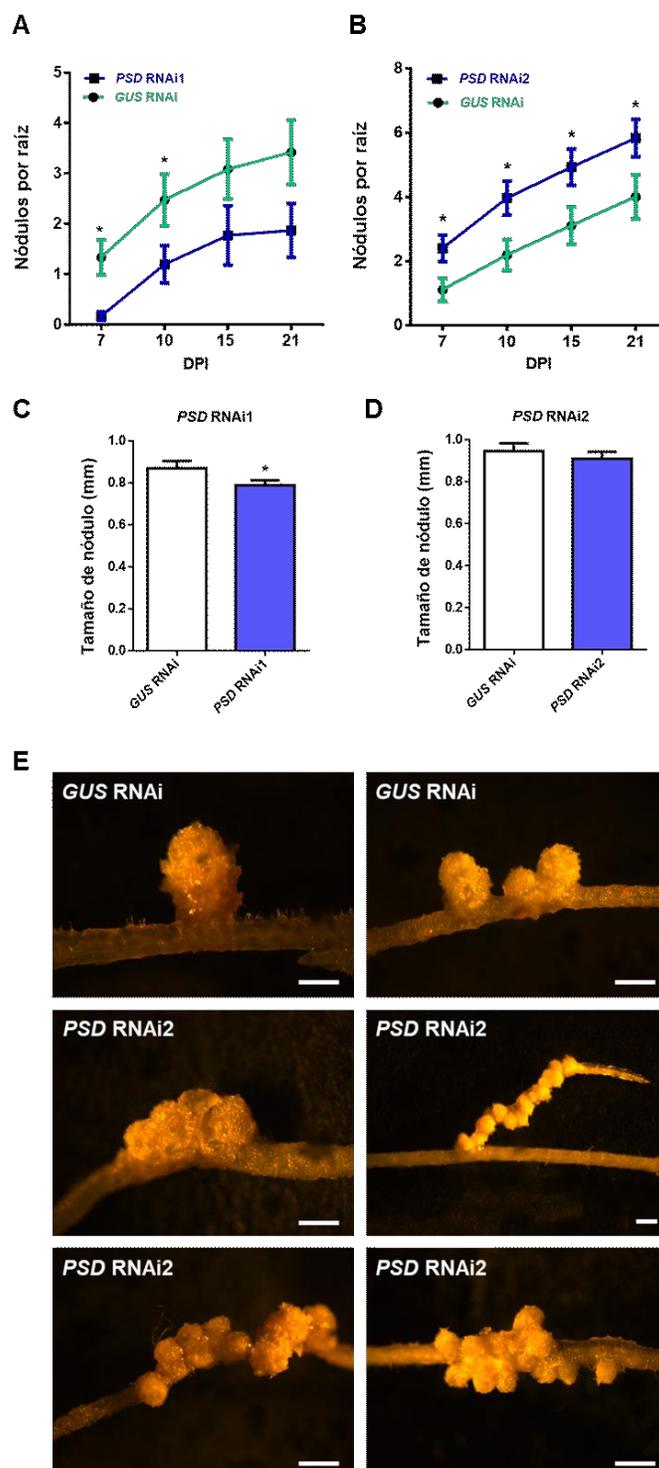


Figura 38. El silenciamiento de *PSD* afecta la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*. A y B. Nódulos formados por raíz transgénica en plantas transformadas con *PSD* RNAi1 (A), *PSD* RNAi2 (B) o

GUS RNAi como control a los 7, 10, 15 y 21 dpi con *S. meliloti* 1021. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas independientes. Se evaluaron al menos 35 raíces por réplica y condición. **C y D.** Tamaño de los nódulos desarrollados en las raíces *PSD* RNAi1 (**C**), *PSD* RNAi2 (**D**) y *GUS* RNAi cuantificado a los 21 dpi. Al menos 55 nódulos fueron medidos en cada condición en cada una de las 3 réplicas biológicas independientes. Los datos corresponden a la media \pm SEM, y los asteriscos indican valores estadísticamente significativos un *t-test* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*). **E.** Imágenes representativas de nódulos desarrollados en raíces *GUS* RNAi o *PSD* RNAi2 a 21 dpi. La barra de escala en la primera imagen corresponde a 0,3 mm y en el resto de las imágenes a 0,2 mm.

3.4. *PSD* es necesario para la infección por *S. meliloti*.

Con el objetivo de determinar si *PSD* es requerido para el proceso de infección bacteriana, raíces transformadas con las construcciones *PSD* RNAi1, *PSD* RNAi2 o *GUS* RNAi fueron inoculadas con una cepa de *S. meliloti* 1021 que expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente roja (RFP). La cuantificación de la densidad de hilos de infección muestra que las raíces *PSD* RNAi1 y *PSD* RNAi2 forman menor cantidad de hilos de infección que las raíces control *GUS* RNAi (52 % y 36 % menos, respectivamente) (Figuras 39A y 39B). Los hilos de infección formados fueron clasificados en base a su grado de progresión según se encuentran en el pelo radical, se ramifican en las células epidérmicas o alcanzan el córtex de la raíz. Los resultados revelaron diferencias significativas en el grado de progresión de los hilos de infección entre plantas control y las plantas que portan las construcciones *PSD* RNAi1 y *PSD* RNAi2. Mientras que las plantas control presentaron la mayoría de los hilos elongados hasta alcanzar las células epidérmicas o las del córtex, las plantas que expresan la construcción *PSD* RNAi1 presentaron la mayoría de los eventos de infección detenidos dentro del pelo radical (77 % de los eventos, comparado con 40 % en *GUS* RNAi) (Figura 39C). Por otra parte, en el caso de las plantas transformadas con la construcción *PSD* RNAi2, la mayoría de los eventos de infección progresaron hacia el córtex (70 % de los eventos), comparado con el porcentaje de hilos de infección que alcanzaron el tejido cortical en las plantas *GUS* RNAi (37 % de los eventos) (Figura 39D). Estos resultados sugieren que *PSD* afecta negativamente la iniciación de los eventos de infección, y que el silenciamiento de dicho lincRNA utilizando RNAis correspondientes a diferentes regiones del locus *PSD* altera diferencialmente la progresión de dichos eventos hacia las células corticales en división, las cuales van a dar lugar a la formación del primordio del nódulo.

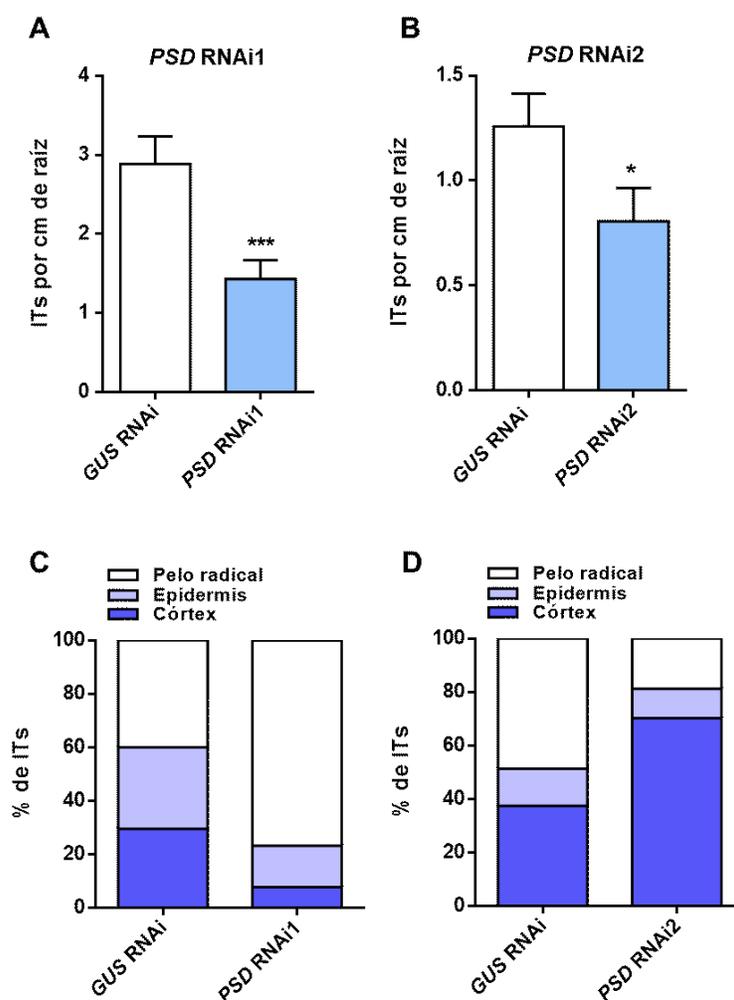


Figura 39. El silenciamiento de *PSD* afecta la iniciación y la progresión de los eventos de infección. A y B. Cuantificación de hilos de infección (ITs) por centímetro de raíz en las raíces *PSD* RNAi1 (A), *PSD* RNAi2 (B) o *GUS* RNAi a 7 los dpi con *S. meliloti* marcado con RFP mediante un microscopio de fluorescencia. C y D. Porcentaje de eventos de infección que se encuentran detenidos en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces *PSD* RNAi1 (C), *PSD* RNAi2 (D) o *GUS* RNAi a los 7 dpi. Los datos corresponden a la media \pm SEM y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 35 raíces por cada condición y ensayo.

4. Identificación de *targets* putativos de *PSD*

Como se mencionó previamente en la introducción, los lincRNAs transcritos a partir de regiones intergénicas son definidos como lincRNAs, mientras que aquellos que son transcritos a partir de la hebra antisentido de un gen codificante, son definidos como *cis*-NAT RNAs. Los lincRNAs que son capaces de unirse a otros mRNAs por complementariedad parcial de bases son definidos como *trans*-NAT RNAs (por *trans*-

Natural Antisense Transcripts; Lapidot and Pilpel, 2006). Los *trans*-NATs presentan una complementariedad de secuencia imperfecta y son capaces de unirse a más de un RNA *target* formando complejas redes regulatorias (Li *et al.*, 2007). Con el objetivo de identificar *targets* putativos de *PSD*, se realizó una búsqueda por homología de secuencia utilizando la herramienta *Short Nucleotide Sequence-Nucleotide Blast* disponible en el *Medicago truncatula A17 r5.0 genome portal* (Pecrix *et al.*, 2018), que permite el alineamiento de secuencias cortas e imperfectas, usando como referencia el genoma de *Medicago truncatula A17 r5.0*. La razón para tomar como referencia en esta parte del trabajo esta versión del genoma de *M. truncatula* es que esta anotación ha permitido un análisis más profundo de los lncRNAs, identificando 1037 lncRNAs que aumentan su expresión en respuesta a la inoculación. A su vez, el estudio de Pecrix *et al.*, (2018) permitió describir la distribución física en el genoma de genes regulados diferencialmente durante la organogénesis del nódulo, y evidenciar que estos genes corregulados suelen estar agrupados en *clusters*, a los que llamaron islas simbióticas. Estos grupos contienen tanto genes codificantes de proteínas, así como también numerosos lncRNAs. A partir de la búsqueda por BLAST se obtuvieron cuatro posibles *targets* de *PSD*, dos de ellos, MtrunA17_Chr4g 1025665 y MtrunA17_Chr8g 1037221 son *cis*-NATs RNAs, cuyas hebras sentido codifican para una proteína hipotética y para la ribonucleasa H *Putative ribonuclease H-like domain, reverse transcriptase zinc-binding domain-containing protein*, respectivamente. Los dos *targets* putativos restantes corresponden a MtrunA17_Chr3g0090221 y MtrunA17_Chr7g0216141, ambos codificantes de *Putative late nodulines*. Los cuatro posibles genes *targets* están localizados en islas simbióticas y, al analizar los patrones de expresión de los cuatro candidatos, se pudo observar que todos ellos se acumulan a niveles altos en nódulos en comparación con raíces no inoculadas, mientras que *PSD* sigue un comportamiento opuesto (Figura 40A). Al analizar los patrones de expresión en las distintas zonas de nódulo se pudo ver que MtrunA17_Chr4g1025665 y MtrunA17_Chr8g 1037221 se acumulan particularmente en las zonas de diferenciación (zona IId/II) y de fijación de nitrógeno (zona III), mientras que MtrunA17_Chr3g0090221 y MtrunA17_Chr7g0216141 exhiben la mayor acumulación en las zonas de infección

(zona IIp) y diferenciación (zona II d) (Figuras 40B). Contrariamente, *PSD* se acumula mayormente en la región meristemática (zona I) (Figura 40B).

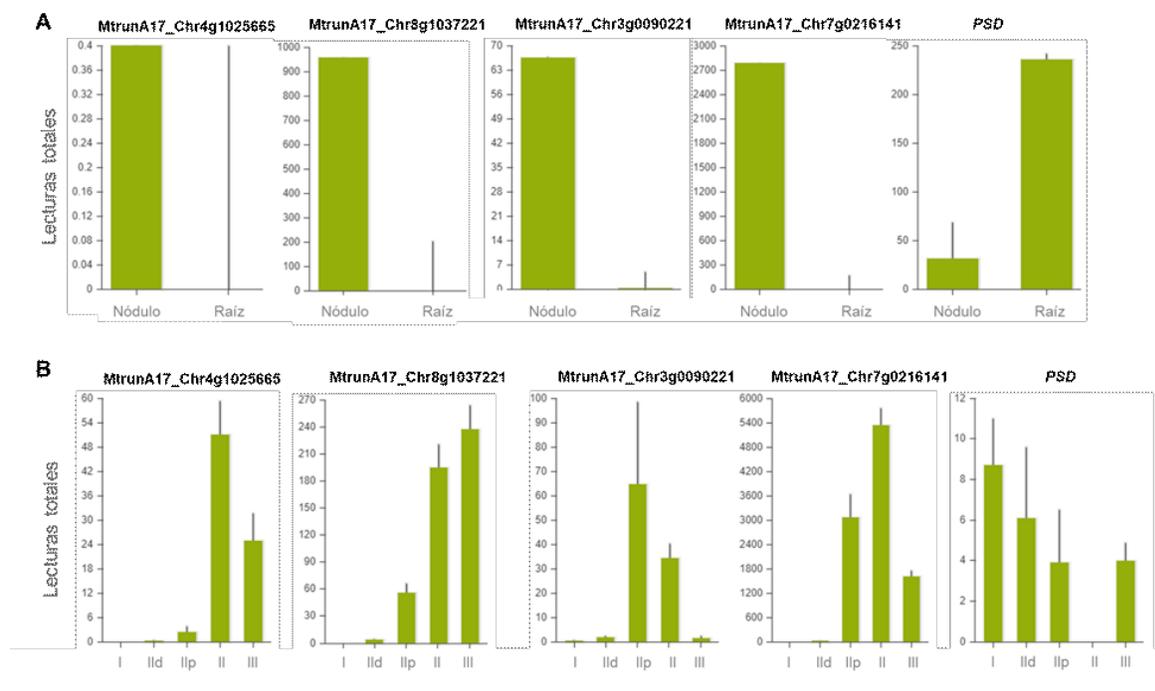


Figura 40. Análisis de expresión de los *targets* putativos de *PSD*. **A.** Niveles estacionarios de los transcritos MtrunA17_Chr4g1025665, MtrunA17_Chr8g1037221, MtrunA17_Chr3g0090221, MtrunA17_Chr7g0216141 y *PSD* en tejido de raíces y nódulos de 15 dpi. Datos obtenidos por RNA-seq (Roux et al, 2014). **B.** Niveles estacionarios de los transcritos de MtrunA17_Chr4g1025665, MtrunA17_Chr8g1037221, MtrunA17_Chr3g0090221, MtrunA17_Chr7g0216141 y *PSD* en las distintas zonas de nódulo de 15 días. I: región apical con células pequeñas correspondiente a la zona meristemática; II d y II p: zona de infección, dividida en distal y proximal (II d y II p, respectivamente) que contiene células en diferenciación y en proceso de infección; II: zona de diferenciación, III zona de fijación de nitrógeno. Los datos de RNA-seq de diferentes zonas del nódulo fueron obtenidos por microdissección láser seguida de RNA-seq (Roux *et al*, 2014).

Al analizar la región de *PSD* en la que se da la complementariedad de secuencia entre este lincRNA y sus *targets* putativos, se pudo observar que, en los cuatro casos se da en la región cercana al 3' de *PSD*, entre las bases 1050 y 1201. En el caso del lincRNA MtrunA17_Chr4g1025665 la región de complementariedad de bases con *PSD* se da en la parte central de este transcripto (Figura 41A), mientras que en el caso del lincRNA MtrunA17_Chr8g1037221 se da hacia el 3' de esta unidad transcripcional (Figura 41B). En los casos de MtrunA17_Chr3g0090221 y MtrunA17_Chr7g0216141 la complementariedad de bases con *PSD* se da en la región 3' UTR (Figura 41C y 41D). Ambas unidades transcripcionales

presentan una región 3' UTR particularmente larga. No se identificó ninguna otra región complementaria en el resto del transcrito. Al evaluar si se generan siRNAs a partir de *PSD*, pudo observarse que este *locus* es fuente de siRNAs de 24 nt (Figura 41E), los cuales podrían estar generándose a partir de estas regiones doble cadena generadas ya sea por complementariedad parcial entre *PDS* y sus *targets* putativos o bien o por la acción de una RNA polimerasas dependientes de RNA. Estos resultados sugieren que *PSD1* podría unirse por complementariedad parcial de bases a estos posibles genes *target* regulando su expresión, su asociación a la maquinaria traduccional, su estructura o su estabilidad.

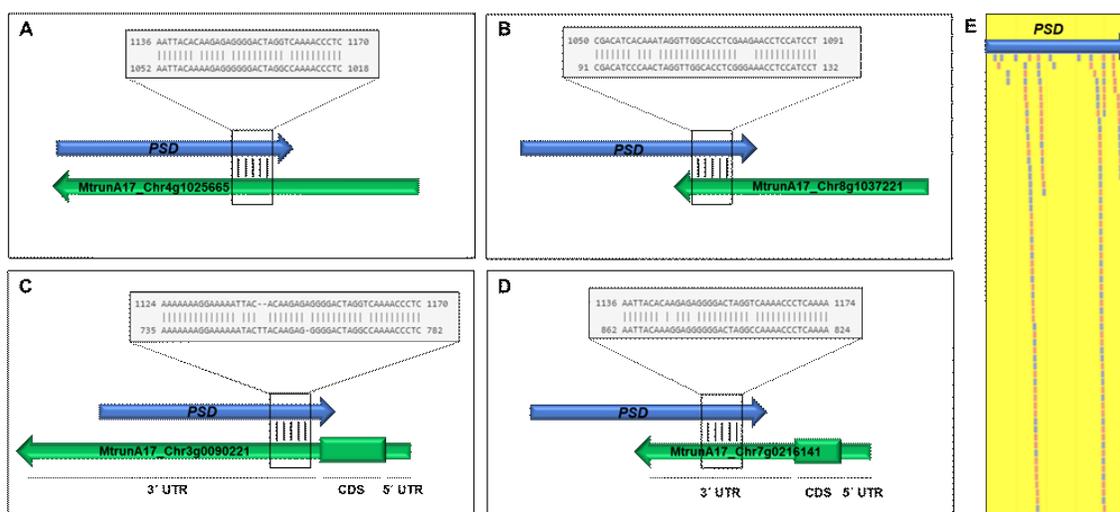


Figura 41. Regiones de complementariedad entre *PSD* y sus *targets* putativos. Regiones de complementariedad entre *PSD* y MtrunA17_Chr4g1025665 (A), MtrunA17_Chr8g103722 (B), MtrunA17_Chr3g0090221 (C) y MtrunA17_Chr7g0216141 (D). Las flechas azules representan a *PSD* y las verdes a los *targets* putativos. El recuadro en cada imagen muestra la región de complementariedad. En C y D se muestra la región correspondiente al 3' UTR, CDS y 5' UTR de MtrunA17_Chr3g0090221 y MtrunA17_Chr7g0216141 E. siRNA de 24 nts generados a partir de *PSD*. La flecha azul representa a *PSD*. Las pequeñas líneas celestes y rosas representan los siRNA de 24 nts.

Discusión

1. Reclutamiento selectivo de mRNAs a la maquinaria traduccional en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno

Los resultados presentados en este trabajo resaltan la importancia de la regulación traduccional y la estabilidad de los mRNAs en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios. Ambos procesos contribuyen significativamente a coordinar y modular la expresión génica durante el desarrollo o la adaptación de las plantas a condiciones ambientales variables (Bailey-Serres *et al.*, 2009). En el presente trabajo de tesis planteamos como hipótesis que la regulación a nivel de la traducción y el decaimiento de los transcriptos contribuyen a modular la expresión génica durante la reprogramación de las células de la raíz para la endosimbiosis fijadora de nitrógeno. Se consideró también que los lncRNAs podrían tener un rol regulatorio de la traducción durante este proceso. Para poner a prueba dichas hipótesis y obtener evidencias de la importancia de la regulación traduccional durante la simbiosis, se caracterizaron los cambios en los mRNAs y lncRNAs asociados a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación con rizobio. Para ello se aplicó la técnica de TRAP (Zanetti *et al.*, 2005, Reynoso *et al.*, 2013) seguida de RNA-seq. Esta técnica permitió caracterizar los cambios en la asociación de los RNAs a la maquinaria traduccional, evidenciando que la traducción selectiva de mRNAs contribuiría a la regulación de la expresión génica en un estadio temprano de la simbiosis, a la vez que proporcionó información sobre los mecanismos moleculares asociados con la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo. Un aspecto notable de nuestros resultados fue la limitada correlación entre la regulación a nivel transcripcional y traduccional observada en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, lo que indicaría que el control traduccional contribuye significativamente a la reprogramación de la expresión génica en las células de raíz comprometidas para la simbiosis. Una pobre correlación entre la transcripción y traducción se describió también en la respuesta inmune de plantas de *A. thaliana* activadas por patrones moleculares asociados a patógenos o proteínas efectoras de bacterias patógenas (Meteignier *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017), lo que evidencia una falta de correspondencia entre estos dos niveles de regulación en diferentes interacciones planta-microorganismo. Meteignier *et al.*, (2017) demostró que, durante la activación de la inmunidad activada por receptores, el traductoma de *A. thaliana* exhibe un cambio global en la traducción priorizando la respuesta de defensa por sobre el crecimiento de la planta.

El análisis del traductoma de la raíz de *M. truncatula* al cabo de 48 hpi con *S. meliloti* permitió identificar un número importante de genes simbióticos que exhiben regulación positiva tanto a nivel transcripcional como traduccional, como por ejemplo *ENOD11*, *ERN1*, *NIN* y *NF-YA1*, entre otros. Este resultado sugiere que el producto funcional de estos genes sería requerido en estas etapas tempranas de la interacción en las que fueron obtenidas las muestras. En estos casos, los transcriptos serían exportados al citoplasma donde, luego de pasar los controles de calidad, serían rápidamente reclutados en los polisomas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente en esta sección, los resultados también mostraron que algunos mRNAs están sujetos a una traducción selectiva. Ejemplos de genes no correlacionados a nivel transcripcional y traduccional fueron *AGN* y *KTN*, relacionados con la regulación transcripcional y la remodelación de la cromatina. Si bien sus transcriptos se acumularon a mayores niveles en raíces inoculadas respecto a las raíces control, se observó una disminución de los niveles de asociación a polisomas. Este resultado sustenta la idea de que los incrementos en la abundancia de los transcriptos en respuesta a un estímulo ambiental no necesariamente se correlacionan con un incremento en la síntesis de la proteína codificada. Este tipo de regulación traduccional fue reportada previamente para un grupo de genes en plantas de *A. thaliana* privadas de oxígeno por períodos cortos (Branco-Price *et al.*, 2008) o bien en respuesta al tratamiento con giberilinas, (Ribeiro *et al.*, 2012). Fue posible identificar también un grupo de transcriptos que presentan modificaciones pequeñas o nulas o disminuyen sus niveles estacionarios, pero aumentan su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a *S. meliloti*, como es el caso de factores de transcripción de tipo GRAS, JAZ y AP2. Este resultado implica que estos mRNAs se encuentran traduccionalmente inactivos, posiblemente secuestrados en RNPs en raíces no inoculadas y que luego de la inoculación son reclutados a la maquinaria traduccional. Este análisis destaca la importancia de la regulación traduccional como mecanismo necesario para el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran como la integración de la regulación a diferentes niveles puede estructurar temporalmente la respuesta a un proceso biológico complejo que requiere la reprogramación de las células para formar un nuevo órgano, a la vez que una fina coordinación espacial y temporal con el proceso de infección rizobiana.

2. Análisis de transcriptos asociados a la maquinaria traduccional de tipos celulares específicos en respuesta a la inoculación

Teniendo en cuenta que la metodología TRAP permite el análisis de traductomas específicos de un tejido o tipo celular, en este trabajo se buscó caracterizar también la asociación de RNAs a la maquinaria traduccional a nivel de los distintos tipos celulares involucrados en las etapas tempranas de la simbiosis. La formación de un nódulo funcional depende, por un lado, de la activación de las divisiones celulares en el córtex y el periciclo para formar el primordio nodular y por otro, de la infección bacteriana que ocurre en la epidermis (Oldroyd *et al.*, 2011). Por otra parte, el floema transporta los productos fotosintéticos y otros metabolitos requeridos para el desarrollo del nódulo, y existen evidencias del establecimiento de una continuidad simplástica entre el floema y otras células de la raíz que precede a las divisiones corticales durante la formación del nódulo (Complainville *et al.*, 2003). Para evaluar la asociación de mRNAs a polisomas en las células involucradas en la formación del nódulo se utilizó la técnica de TRAP a partir de tejido expresando FLAG- RPL18 bajo promotores que activan la transcripción en tipos celulares específicos de la raíz. El análisis incluyó cuatro genes descritos como inducidos por la inoculación con *S. meliloti*, *ERN1*, *NF-YAI*, *NPL* y *SINA*, y cuatro genes identificados en este estudio como regulados negativamente a nivel traduccional en respuesta a la infección rizobiana; *Cys-rich RLK*, *NCR* y dos genes que codifican proteínas SAUR-like. Se encontró que los mRNAs seleccionados se asocian diferencialmente a polisomas de epidermis, córtex y tejido vascular, verificando la especificidad de la purificación. Para *ERN1* se encontraron los mayores niveles de transcriptos asociados a ribosomas en células epidérmicas y en células acompañantes del floema. Estos resultados concuerdan con lo reportado mediante ensayos de fusión de promotor a GUS, en los que se observa expresión de *ERN1* en pelos radicales cercanos al sitio de infección en etapas tempranas de la simbiosis (Cerri *et al.*, 2012). Al igual que para *ERN1*, en el caso de *NF-YAI* también se encontraron los mayores niveles de transcriptos asociados a ribosomas en células epidérmicas y en células acompañantes del floema. Si bien inicialmente se había reportado que *NF-YAI* se expresa en la región meristemática del nódulo (Combiere *et al.*, 2006), estudios más recientes revelaron que los transcriptos de *NF-YAI* se acumulan en los pelos radicales cercanos al sitio de infección en etapas tempranas de la simbiosis (Laporte

et al., 2013), así como también en las células de la zona de infección del nódulo en estadios más tardíos (Limpens *et al.*, 2013). Estos antecedentes podrían correlacionarse con el incremento de *NF-YAI* en células de la epidermis y del floema a etapas tempranas de la inoculación con *S. meliloti*. Por otro lado, *SINA* mostró un incremento en células corticales, mientras que permaneció sin cambios en respuesta a la inoculación en el resto de los tejidos analizados. Para *NPL* se encontraron los mayores niveles de transcritos asociados a ribosomas en células epidérmicas en respuesta a la inoculación. Este resultado concuerda con la inducción en células epidérmicas frente a la inoculación con *S. meliloti* o NF reportado por Breakspear *et al.*, 2014. Tanto *Cys-rich RLK* como uno de los genes *SAUR* (Medtr8g026730) disminuyeron su asociación a la maquinaria traduccional de manera específica en tejido epidérmico y el transcripto *NCR* mostró una disminución en el traductoma de epidermis y córtex, mientras que el otro gen *SAUR* (Medtr4g072190) analizado disminuyó su asociación a polisomas en tejido cortical y en células acompañantes de floema. La cuantificación de los transcritos analizados mostró que existen comportamientos diferentes para un mismo transcripto dependiendo del tipo celular examinado. A su vez, los resultados indican que los experimentos de TRAP pueden revelar de manera robusta la regulación específica de tipo de celular a nivel traduccional y, además, que la regulación de la traducción funciona de manera independiente en los diferentes tipos celulares implicados en la simbiosis. Esto abre la posibilidad de extender esta aproximación experimental a otros tipos celulares y a escala masiva mediante TRAP-seq para la construcción de un mapa espacial que permita visualizar los cambios en la expresión génica en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

3. El análisis de las variantes alternativas de transcripto permitió identificar genes implicados en la adición/remoción de marcas epigenéticas que son regulados a nivel traduccional en respuesta a *S. meliloti*

Las variantes de transcripto alternativas presentes en los transcriptomas eucariotas son el resultado de eventos de *splicing* alternativo (Reddy *et al.*, 2013), del uso de sitios alternativos de inicio de la transcripción o sitios de corte y poliadenilación alternativos (de Lorenzo *et al.*, 2017). Utilizando herramientas bioinformáticas, identificamos numerosas

variantes de transcriptos presentes en el transcriptoma y el traductoma de raíces de *M. truncatula* que están asociados diferencialmente a la maquinaria traduccional en condiciones simbióticas. Este resultado indica que el procesamiento alternativo de los transcriptos puede influir en la traducción, contribuyendo a modular el componente proteico de las células de raíz comprometidas para la simbiosis. Un número importante de estas variantes de transcripción alternativas codifican proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y la adición o eliminación de marcas epigenéticas, como son los casos de una variante de transcripto del gen Medtr1g094740, que codifica la demetilasa específica de histona LSD1 y una variante de transcripto del gen Medtr7g033685, que codifica una proteína con una alta identidad de secuencia a la proteína *Defective In Meristem Silencing 4/RNA-Directed DNA Methylation 4 (DMS4/RDM4)* de *A. thaliana*, la cual ha sido involucrada en el mecanismo de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM) mencionado en la introducción. Esta reprogramación traduccional temprana de los mRNAs preexistentes podría contribuir a regular la producción de proteínas que desempeñarán funciones claves en la regulación transcripcional en etapas posteriores de la interacción simbiótica, contribuyendo así a la reprogramación transcripcional de las células comprometidas para la simbiosis, proceso que probablemente esté mediado por la remodelación de la cromatina y la unión de factores de transcripción a regiones reguladoras del DNA. Nagymihaly *et al.*, (2017) encontró cambios en la metilación del DNA y la metilación y acetilación de histonas para un subconjunto de genes simbióticos en *M. truncatula*. Además, la reciente caracterización en *M. truncatula* del gen *DEMETER*, el cual codifica una DNA demetilasa esencial para el desarrollo de nódulos simbióticos, respalda el papel crítico de la metilación del DNA en la regulación de la expresión génica durante la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios (Satge *et al.*, 2016). Lo antes expuesto apuntala la noción de que los cambios en el epigenoma contribuyen a la reprogramación de la expresión génica durante la diferenciación de las células simbióticas, y la regulación traduccional de los genes que participan de estos cambios podría ser un paso inicial de esta reprogramación.

4. ***SUPERKILLER3* participa del desarrollo y de la supervivencia de las bacterias durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.**

El análisis de variantes de transcripción alternativas asociadas diferencialmente a la maquinaria traduccional también permitió identificar una isoforma del gen Medtr5g004660, el cual codifica la proteína SUPERKILLER3, una de las subunidades del complejo que se asocia al exosoma como parte de la vía de degradación de RNA 3'-5'. El mecanismo de degradación de RNA 3'-5' actúa en el recambio normal del mRNA celular, así como también en los mecanismos de control de calidad que degradan selectivamente los mRNAs aberrantes para evitar la traducción de proteínas no funcionales (Schmid and Jensen, 2008). A la vez, el complejo SKI funciona como un supresor del silenciamiento génico postranscripcional al bloquear la producción de siRNA secundarios derivados del clivaje endonucleolítico de transgenes y mRNAs endógenos, un factor crítico del mecanismo de control de los procesos de desarrollo en la parte aérea de las plantas de *A. thaliana* (Branscheid *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015, Zhao and Kunst, 2016). En este trabajo se observó que el silenciamiento de *SKI3* altera la formación de nódulos y la supervivencia de las bacterias que se encuentran en su interior, pero no el proceso de infección, por lo que se propone que *SKI3* cumpliría un rol importante en la discriminación de los mRNAs endógenos que estarán sujetos a una traducción activa en polisomas y aquellos que serán enviados a degradación durante el desarrollo del nódulo, destacando la importancia de los mecanismos de control y degradación de mRNAs durante el establecimiento de la interacción simbiótica. Si bien la regulación traduccional de *SKI3* se observó a las 48 hpi, mucho antes de que se revelara el fenotipo del nódulo, las divisiones de células corticales y del periciclo ya están activas a este tiempo en raíces *M. truncatula* (Xiao *et al.*, 2015). Además, encontramos que la inducción rizobiana de *ENOD40* y *ERN1*, dos genes asociados a las divisiones celulares (Crespi *et al.*, 1994; Charon *et al.*, 1997; Middleton *et al.*, 2007) está disminuida a las 48 hpi en las raíces silenciadas en *SKI3*. La falta de inducción de estos dos genes simbióticos podría contribuir a explicar el menor número de nódulos formados en raíces con niveles reducidos de *SKI3* respecto a las raíces control. Un estudio reciente encontró que el complejo SKI de levadura podría actuar sobre los mRNAs unidos a los polisomas al interactuar físicamente con los ribosomas 80S y los polisomas (Schmidt *et al.*, 2016). Por lo tanto, se hipotetiza que *SKI3* podría estar

controlando el PTGS de genes específicos en las primeras etapas de desarrollo de nódulos, lo que luego se refleja en el número y la ocupación de estos. Este análisis también permite ejemplificar cómo el estudio del traductoma puede contribuir a identificar genes con funciones críticas en un proceso de gran importancia agronómica como es la fijación biológica de nitrógeno.

5. Cambios en la degradación y en el clivaje endonucleolítico de mRNAs en plantas silenciadas en *SKI3* y en respuesta a *S. meliloti*

Con la finalidad de evaluar si el silenciamiento de *SKI3* en las raíces de *M. truncatula* altera la degradación de mRNAs en respuesta a *S. meliloti*, se realizó un mapeo de los RNAs clivados que no presentan CAP en el extremo 5' (GMUCT 2.0) en las raíces *GUS* RNAi y *SKI3* RNAi inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control a las de 48 hpi. Esta estrategia permitió identificar específicamente los productos de clivaje por miRNAs o siRNA y los mRNAs sin *cap* en el extremo 5' y sus cambios en la nodulación. Se identificaron globalmente los picos correspondientes a los extremos 5' acumulados diferencialmente en todas las condiciones. Uno de los transcriptos afectados por el silenciamiento de *SKI3* fue un factor de transcripción de respuesta a etileno de la familia *AP2*. Dicho miembro de la familia *AP2* de *M. truncatula* es el ortólogo putativo del represor transcripcional de soja *NNCI*, *target* del miR172. Estudios realizados en soja han demostrado que *NNCI* controla el número de nódulos al actuar como un regulador negativo de la expresión de *ENOD40*, gen simbiótico clave requerido para la activación de las divisiones celulares en el periciclo y córtex de la raíz durante la formación de nódulos. Wang *et.al.*, (2014) demostró que cuando los niveles de *NNCI* se incrementan -ya sea mediante la expresión de un *target mimic* de miR172 o mediante la expresión de una forma de *NNCI* resistente al clivaje endonucleolítico mediado por miR172- se detienen las divisiones celulares corticales necesarias para la formación del primordio del nódulo. En este trabajo encontramos que la degradación de *AP2* mediada por el clivaje endonucleolítico de miR172 se encuentra disminuida en las raíces que expresan la construcción *SKI3* RNAi. Además, encontramos que la inducción de *ENOD40* está alterada a las 48 hpi en estas raíces. Por lo tanto, el silenciamiento del componente *SKI3* del

complejo SKI reduciría la degradación de *AP2* desencadenada por la acción del miR172. Esto mantendría un elevado nivel de este represor transcripcional, el cual bloquearía la inducción de *ENOD40*, contribuyendo así a explicar el menor número de nódulos formados en las raíces de *SKI3* RNAi. Si bien el PTGS es un mecanismo general de eliminación de transcriptos endógenos y es activado cuando el decaimiento 3'-5' mediado por el exosoma está comprometido (Zhang *et al.*, 2015), Zhao and Kunst, (2016) demostró que la eficiencia del PTGS del transcripto *CER3* se encuentra disminuida cuando el complejo SKI no es funcional, probablemente porque en ausencia de un complejo SKI funcional, los transcriptos de *CER3* son degradados por la vía 5'-3'. La disminución de la eficiencia del PTGS en las plantas mutantes simples *ski* y dobles *ski/cer7* comparados con los mutantes simples *cer7* sugiere que un complejo SKI funcional es necesario para un correcto control de mRNAs mediante el mecanismo de PTGS (Zhao and Kunst, 2016). En conjunto, nuestros datos y los reportados previamente en bibliografía apuntan a un modelo en el que *SKI3* es regulado a nivel traduccional en las primeras etapas de la simbiosis fijadora de nitrógeno y posteriormente a nivel transcripcional durante el desarrollo del nódulo. Este aumento en la traducción de *SKI3* contribuiría a modular la degradación de *AP2* causada por acción del miR172, la cual es necesaria para la organogénesis del nódulo. Los resultados presentados en esta Tesis destacan la importancia de los mecanismos de decaimiento de los RNAs en el establecimiento exitoso de la interacción simbiótica.

6. Asociación diferencial de lncRNAs a la maquinaria traduccional en respuesta a *S. meliloti*.

Además de los genes que codifican proteínas, en este trabajo se identificó un número significativo de lncRNAs asociados a la maquinaria traduccional. Esta asociación ha sido reportada previamente en levaduras (Ingolia *et al.*, 2013), pez cebra (Chew *et al.*, 2012; Bazzini *et al.*, 2014), mamíferos (Guttman *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017) y plantas (Jiao and Meyerowitz, 2010; Juntawong *et al.*, 2014, Bazin *et al.*, 2017), lo que plantea la cuestión de si esta asociación a los polisomas involucra la traducción de estos RNAs, produciendo polipéptidos de relevancia biológica. Se han encontrado lncRNAs en vertebrados y plantas que codifican péptidos conservados (Guttman *et al.*, 2013; Anderson

et al., 2015; Nelson *et al.*, 2016; Bazin *et al.*, 2017), lo que sugiere que la traducción de los pequeños ORFs presentes en ciertos lncRNAs podría tener implicaciones evolutivas y funcionales. Sin embargo, el análisis de los sORFs presentes en los lncRNAs identificados en esta Tesis indicó que aquellos regulados diferencialmente en las muestras TRAP en respuesta a la inoculación no codificarían péptidos conservados. Este resultado sugiere que dichos lncRNAs podrían actuar como RNA regulatorios durante la interacción simbiótica establecida entre leguminosas y rizobios, sin involucrar la traducción de sORFs. Estos sORFs podrían estar cumpliendo un rol en la estabilización de estos lncRNAs, evitando su degradación a través de los mecanismos celulares de NMD, permitiéndoles cumplir funciones en la regulación de la traducción de mRNAs o en otros procesos como la regulación de la actividad de miRNAs, el secuestro de proteínas y el control de la traducción (Kung *et al.*, 2013; Ariel *et al.*, 2015). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos encontrado recientemente que el gen *Trans-Acting Short Interference RNA3 (TAS3)* produce dos isoformas alternativas de transcritos cuya asociación a los polisomas cambia durante el proceso simbiótico. La isoforma larga da lugar a la producción de tasiRNAs luego del clivaje endonucleolítico producido por la acción del complejo miR390-AGO7, mientras que la isoforma corta, que se asocia preferencialmente a polisomas en condiciones simbióticas, secuestra al miR390, impidiendo su acción (Traubenik *et al.*, 2019). Dado que el miR390 es un regulador negativo de la formación de nódulos y la infección rizobiana (Hobecker *et al.*, 2017), al secuestrar al miR390 esta isoforma corta contribuiría a inactivar la vía miR390/TAS3 promoviendo de esta manera la formación de nódulos. Este ejemplo ilustra como la unión de RNAs no codificantes a polisomas puede estar asociada a la localización especial de un proceso independientemente de la traducción.

Teniendo en cuenta que los lncRNAs exhiben una expresión específica de tejido, o bien se expresan únicamente en una condición particular, en este trabajo se buscó caracterizar también la asociación de lncRNAs a la maquinaria traduccional a nivel de los distintos tipos celulares involucrados en las etapas tempranas de la simbiosis. Para realizar este análisis se seleccionaron tres lncRNAs que disminuyen su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación y uno que la aumenta. Los resultados sugieren que la asociación de los lncRNAs a la maquinaria traduccional y su respuesta a la infección por rizobios se ve fuertemente influenciada por el contexto específico de tejido. Estos

lncRNAs podrían estar siendo expresados diferencialmente en los diferentes tejidos implicados en la interacción simbiótica y/o estar siendo reclutados en polisomas para cumplir funciones regulatorias específicas en cada tipo celular.

7. El lncRNA *POSEIDON* es requerido para el proceso de infección y para la organogénesis del nódulo.

Dentro de los lncRNAs que se asocian diferencialmente a la maquinaria traduccional, se decidió abordar el estudio y la caracterización del lincRNA *POSEIDON* (Medtr3NC032155), dado que el mismo disminuye significativamente su asociación a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, pero no presenta cambios importantes a nivel del transcriptoma. Si bien el alineamiento de las lecturas de RNA-seq obtenidas en el presente estudio al genoma de *M. truncatula* indicó que *PSD* tendría un tamaño aproximado de 1351 pb, en este trabajo pudimos identificar dos posibles RNAs generados a partir del locus de *PSD*, uno de al menos 1115 pb y otro de aproximadamente 450 pb. Sin embargo, no descartamos que el locus *PSD* pueda dar lugar a otras variantes alternativas de transcriptos no identificadas en este estudio, o que son transcriptas en otras condiciones fisiológicas. Cabe destacar que la identidad del RNA de 450 pb aún debe verificarse mediante secuenciación.

Para evaluar la posible función de *PSD* en la simbiosis fijadora de nitrógeno se generaron dos RNAi como estrategia de silenciamiento. Se observó en ambos casos que la disminución de los niveles de *PSD* afecta la infección y el desarrollo de los nódulos. El silenciamiento de *PSD* por acción del RNAi1, el cual silenciaría los RNA largos (de al menos 1115 pb), causó una disminución de los hilos de infección, y aquellos que se forman quedaron detenidos mayoritariamente en los pelos radicales, sin que progresen hacia el córtex. Al realizar el silenciamiento de *PSD* por acción del RNAi2, el cual silenciaría a ambos RNAs (las versiones largas y el de 450 pb detectado por RACE), se observó también una disminución en el número de eventos de infección, pero en este caso, la gran mayoría de los hilos formados progresaron rápidamente hacia el córtex. Sorpresivamente, el fenotipo de organogénesis del nódulo resultó opuesto en ambas estrategias de silenciamiento; mientras el número de nódulos disminuyó en las raíces que expresan la construcción *PSD* RNAi1, la cantidad de nódulos aumentó considerablemente en todos los

tiempos analizados en las raíces que expresan la construcción *PSD RNAi2*. Los nódulos desarrollados en este último caso presentaron alteraciones tanto en la morfología como en la distribución espacial, encontrándose en muchos casos agrupados en *clusters*, sugiriendo que *PSD* podría estar participando de los mecanismos moleculares generales que participan durante la infección rizobiana, así como también en el control del número y la distribución espacial de los nódulos. Las plantas leguminosas, en orden de mantener un balance del costo energético, controlan el número de nódulos formados en respuesta a los eventos de infección existentes mediante el proceso de autorregulación de la nodulación. No está claro en qué etapa del desarrollo del nódulo se ejerce esta autorregulación, pero se cree que se dispara al momento de ocurrir las divisiones celulares (Li *et al.*, 2009), regulando la velocidad de las divisiones corticales y restringiendo la nodulación ya en etapas tempranas (Mathews *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta el fenotipo expuesto, se podría especular que *PSD* podría formar parte o regular alguna etapa de este proceso. Existen dos mecanismos de regulación espacial de formación de los nódulos, aunque las bases moleculares aún se desconocen. Uno de estos mecanismos restringe la formación de nódulos a la zona de pelos radicales en crecimiento, mientras que el otro da lugar a una distribución a lo largo de esa región, impidiendo la excesiva cercanía de los nódulos formados (Reid *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). La formación de *clusters* en raíces en que *PSD* está silenciado por acción del RNAi 2 sugiere que este lincRNA podría ser un regulador de este segundo mecanismo de control espacial de la organogénesis del nódulo. Un fenotipo similar fue observado en respuesta a la interferencia con la vía del miR390/*TAS3* a través de la expresión de un RNA *mimic* de miR390 o el silenciamiento transcripcional de *ago7* (Hobecker *et al.*, 2017). Esto sugiere una interesante conexión entre el *pathway* regulatorio miR90/*TAS3* y la acción de los RNAs derivados del locus *PSD* en el control espacial de la formación de nódulos.

Los lincRNAs son capaces de unirse a otros mRNAs por complementariedad parcial de bases, actuando como *trans*-NATlncRNAs, regulando genes *target* a través de una amplia gama de mecanismos regulatorios. Los mecanismos mejor caracterizados mediante los cuales los lincRNAs actúan en la regulación de la expresión génica implican cambios en el nivel del estado estacionario o la estructura del RNA generando cambios en la transcripción, la estabilidad de los RNAs, cambios en la estructura de la cromatina o modulando el *splicing* alternativo (Rinn and Chang, 2012; Bonasio and Shiekhattar, 2014;

Chekanova, *et al.*, 2015; Ransohoff *et al.*, 2018). En esta línea, se identificaron cuatro *targets* putativos de *PSD* por homología de secuencia parcial, dos de ellos son lncRNAs y el resto codifican nodulinas tardías. La región de *PSD* implicada en todos los casos corresponde a la región cercana al extremo 3' del RNA de 1115 pb generado a partir del locus *PSD*, por lo que sería esta variedad del RNA la que estaría actuando como *trans-NATlncRNA*. De todas formas, no puede descartarse la posibilidad de que se generen otros RNAs a partir de esta región del locus de *PSD*. Se pudo observar también que esta región de *PSD* da lugar a la formación de siRNAs de 24nt, los que podrían estar produciéndose a partir de la doble hebra generada por complementariedad de bases parcial con los *targets* putativos. Estos *targets* han sido identificados mediante análisis *in silico*, por lo que se requiere su validación empírica. En este sentido, la técnica de purificación por afinidad de RNAs utilizando oligonucleótidos biotinilados seguida de RNA-seq permitirá obtener información más robusta acerca de los *targets* de *PSD*.

Al igual que el resto de los transcritos, los lncRNAs están sujetos a una regulación transcripcional que afecta su biogénesis, su procesamiento y su decaimiento. El inicio alternativo de la transcripción, así como también el APA, permite la producción de distintas variantes a partir de un mismo gen, variantes que podrían variar en su función, o en su regulación post-transcripcional. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten especular la existencia de al menos dos RNAs generados a partir del locus *PSD*, los cuales poseen diferentes sitios de inicio de la transcripción. El uso de sitios de inicio de la traducción alternativos puede impactar en la eficiencia traduccional (Pozner *et al.*, 2000), en este caso en la asociación de *PSD* a la maquinaria traduccional. Los fenotipos asociados al silenciamiento de estos RNAs permiten plantear la hipótesis de una regulación entre estas isoformas a nivel del inicio de su transcripción y poliadenilación, priorizando una sobre la otra, manteniendo un equilibrio necesario para el correcto establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, más experimentos son requeridos para establecer claramente las variantes transcripcionales que derivan del locus *PSD*.

8. Consideraciones finales

En conclusión, el análisis comparativo del transcriptoma y el traductoma de las células de la raíz en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno reveló que tanto los mRNAs como los lncRNAs están sujetos a una regulación a nivel de su abundancia, así como de su asociación a los polisomas. Además, el procesamiento co-transcripcional, y los mecanismos de degradación también influyen en las proteínas que serán sintetizadas en las células, contribuyendo a dar forma a los cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en las primeras etapas del proceso simbiótico. El estudio realizado en esta Tesis resalta la importante contribución de los niveles de regulación que afectan tanto la estabilidad como la traducibilidad de los transcriptos, a los cambios de la expresión génica que ocurren durante el establecimiento de la asociación simbiótica. Los avances alcanzados permiten una mejor comprensión del fenómeno biológico que conduce a la fijación biológica de nitrógeno, a la vez que amplían la base de datos sobre la cual se seleccionan genes con potencial utilización en el mejoramiento de caracteres agronómicos relevantes en plantas leguminosas.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

1.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Medicago truncatula* variedad Jemalong A17 obtenidas del Institut National de la Recherche Agronomique INRA, Montpellier, Francia.

1.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (Taylor *et al.*, 1993) y TOP10, utilizadas para la multiplicación y manutención de vectores plasmídicos, fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con los antibióticos respectivos a 37 °C y 250 rpm de agitación, o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB con agar adicionado. La cepa de *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 (Quandt *et al.*, 1993), utilizada para la transformación de raíces de *M. truncatula* fue crecida en medio LB líquido o sólido suplementado con los antibióticos respectivos a 28 °C y con agitación a 250 rpm en caso de crecimiento en medio LB líquido. Para los ensayos de inoculación con rizobio se utilizaron la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* (Meade and Signer, 1977) y la cepa 1021 de *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente RFP (Lévy *et al.*, 2004).

2. Vectores de clonado

-pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Vector de clonado utilizado para la recombinación de secuencias en los vectores compatibles con el sistema GATEWAY. El plásmido posee el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina para su selección en bacterias.

-p35S:HF-RPL18. Vector derivado de p35S:HF, utilizado para la expresión de proteínas. Contiene un epítipo dual HIS- FLAG en su N-terminal (Zanetti *et al.*, 2005, Reynoso *et al.*, 2013). El plásmido posee el gen *Cmr*, que confiere resistencia a cloranfenicol para su selección en bacterias.

-pCO2:FLAG-RPL18. Vector derivado de pGAT:HF que expresa la proteína ribosomal RPL18 de *M. truncatula* bajo el control del promotor pCO2. Se utilizó para expresar la proteína RPL18 en las células del córtex (Mustroph *et al.*, 2009; Traubenik *et al.*, 2019).

-pSUC2:FLAG-RPL18. Vector derivado de pGAT:HF que expresa la proteína ribosomal RPL18 de *M. truncatula* bajo el control del promotor pSUC2 (células acompañantes de

floema). Se utilizó para expresar la proteína RPL18 en las células acompañantes de floema (Mustroph *et al.*, 2009; Traubenik *et al.*, 2019).

-pEXP7:RPL18. Vector derivado de pGAT:HF que expresa la proteína ribosomal RPL18 de *M. truncatula* bajo el control del promotor pEXP7. Se utilizó para dirigir la expresión de la proteína RPL18 en la epidermis de la raíz (Mustroph *et al.*, 2009b; Traubenik *et al.*, 2019).

-pK7GWIWG2D(II). Vector compatible con el sistema GATEWAY para la generación de un RNA de interferencia (RNAi). Posee dos sitios de recombinación opuestos para dar lugar a la formación de una repetición invertida del fragmento seleccionado. El plásmido posee el gen *Sm/SpR*, que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen *KanR*, bajo el control del promotor *nos* (nopalina sintasa), para su selección en plantas. Además, el vector posee el gen de la proteína verde fluorescente GFP como marcador reportero, lo que permite visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopia de fluorescencia.

3. Primers

Los *primers* utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 4, *Anexo I. Primers*.

4. Medios de cultivo

-Medio LB (Luria-Bertani)

Este medio fue utilizado para el crecimiento de las cepas DH5 y TOP10 de *E. coli* y Arqua1 de *A. rhizogenes*. Consiste en 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl a un pH final de 7,2. En los casos en que se utilizó medio sólido se adicionó 15 g/l de agar.

-Medio TY

Este medio fue utilizado para el crecimiento de las cepas de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* RFP. Consiste en 5g/l de triptona, 3 g/l de extracto de levadura y 0,6 g/l de CaCl₂.2H₂O. En los casos en que se utilizó medio sólido se adicionó 15 g/l de agar.

-Medio de preseRación de microorganismos

La conseRación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alicuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 % (v/v). Se almacenaron en freezer a -80 °C hasta su utilización.

-Medio Fahraeus

Este medio fue utilizado para el crecimiento de plantas de *M. truncatula*, tanto *in vitro* como en potes. Está compuesto por CaCl₂.2H₂O 114 g/l, MgSO₄.7H₂O 120 g/l, citrato férrico 5 g/l, KH₂PO₄ 100 g/l, Na₂HPO₄ 150 g/l, KCl₃,73 g/l, H₃BO₃ 1,55 g/l, SO₄Mn.H₂O 0,85 g/l, CuSO₄.5H₂O, 0,13 g/l, ZnSO₄.7H₂O, 0,58 g/l, Na₂MoO₄.2H₂O 0,018 g/l (Fahraeus, 1957). Para el crecimiento en cajas de acrílico se agregaron 10 g/l de agar. En el caso de los ensayos de crecimiento sin la inoculación con rizobio, las plantas fueron cultivadas en medio Fahraeus suplementado con KNO₃⁻ 0.8 mM.

-Antibióticos

Se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos para medios de cultivos sólidos y/o líquidos:

Tabla 2. Antibióticos utilizados en este trabajo. Todas las concentraciones están expresadas en µg/µl.

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>S. meliloti</i> 1021	<i>S. meliloti</i> RFP	<i>M. truncatula</i>
Kanamicina	50	-	-	-	12,5
Espectinomicina	50	200	-	-	-
Estreptomomicina	-	-	200	200	-
Cloranfenicol	35	200	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	5	-

5. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico

5.1.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico Mastercycler gradient (Eppendorf). Las concentraciones finales de los reactivos en la reacción de PCR en un volumen final de 20 µl fueron: buffer de reacción 1 X, MgSO₄ 1,5 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,25 µM, y enzima *Taq Pegasus* 1 U (Productos Bio-Lógicos). Como molde se utilizaron células, plásmidos, gDNA, cDNA o RNA dependiendo del caso. El número de ciclos y el tiempo de elongación fueron diferentes en función del tamaño del fragmento a amplificar. El programa estándar consistió en una primera incubación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura de hibridación indicada, 1 minuto por cada kb a 72 °C y como paso final, 10 minutos a 72 °C. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación, exceptuando los casos de PCR semicuantitativa, en los cuales se utilizaron 25 ciclos. Para la amplificación de fragmentos utilizados en los clonados se utilizó la enzima polimerasa *Pfu* (Productos Bio-Lógicos). Esta enzima posee actividad exonucleasa 3' a 5', lo cual permite la corrección de errores en la amplificación (*proofreading*) y carece de la actividad transferasa terminal. Se siguieron las instrucciones detalladas por el proveedor.

5.2.Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA fueron analizadas en geles de agarosa en un rango de entre 0,5 % y 2 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en TBE 0,5 X (Tris base 0,045 M, H₃BO₃ 0,045 M, EDTA 0,5 mM, pH 7,2) y se agregó bromuro de etidio (BrEt) para visualizar las bandas. Previo al sembrado, se agregó buffer de siembra para DNA (buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, sacarosa 50 % (p/v), azul de bromofenol 1 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0) a cada muestra. Las electroforesis se llevaron a cabo en buffer TBE 0,5 X a voltaje constante (90 V). Las bandas obtenidas, tanto de DNA como de RNA, se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y las imágenes se capturaron con una cámara digital (UVITEC Cambridge).

5.3.Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial PURO Gel Extraction (Productos Bio-Lógicos) siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.4.Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmídico se realizaron de acuerdo con las condiciones indicadas por los proveedores de cada enzima de restricción. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada μg de DNA plasmídico a digerir. Las mezclas de reacción se incubaron durante 2-3 horas a la temperatura óptima de cada enzima en un volumen final de 10 μl . Finalmente, se verificó la correcta digestión mediante electroforesis en geles de agarosa.

5.5.Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY

El kit de clonado pENTR/D-TOPO (Invitrogen) permite la incorporación direccional de un fragmento de PCR en un plásmido compatible con el sistema GATEWAY. El método de clonación se basa en la ligación direccional mediante la enzima topoisomerasa I en uno de los extremos del plásmido. El *primer* forward utilizado para amplificar la secuencia de interés debe contener los nucleótidos *CACC* adicionales en el extremo 5'. Las secuencias de interés fueron clonadas en el vector pENTR/D-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y posteriormente se clonaron en los vectores de destino correspondientes mediante recombinación utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). El vector de destino posee las secuencias attR1 y attR2 para permitir la recombinación con las secuencias attL1 y attL2 del vector pENTR/D-TOPO.

5.6.Preparación de células de *E. coli* DH5 α y TOP10 electrocompetentes

Las células de *E. coli* DH5 α o TOP10 se cultivaron en medio LB durante una noche a 37 °C con agitación. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB y se incubó en las condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600 nm (DO₆₀₀). Luego se centrifugó 10 minutos a 6000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en de glicerol 10 % previamente enfriado a 4 °C. El mismo procedimiento se repitió reduciendo el volumen de solución de glicerol a 4 ml, llegando

luego a la solución final en la que se resuspendió el producto de la centrifugación en 500 μ l de glicerol 10 % (v/v). Finalmente se fraccionó en alícuotas de 40 μ l, se colocaron los tubos rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

5.7.Transformación de células de *E. coli* DH5 α y TOP10 electrocompetentes

Las células competentes se transformaron mediante un pulso de electroporación a 2,2 kV, durante 5 milisegundos, con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 Ω , utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser (BioRad) y cubetas de electroporación de 2 mm de espesor estériles. En las cubetas se colocaron 40 μ l de bacterias competentes previamente mezcladas con 1 μ l del plásmido de interés e inmediatamente se procedió a la electroporación. Luego se agregó 1 ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se incubó 1 h a 37 °C para su recuperación. Finalmente, la suspensión de células fue centrifugada brevemente a 6000 g y resuspendida en 100 – 200 μ l de medio, que fueron sembrados en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

5.8.Minipreparación de DNA plasmídico

Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido correspondiente fueron incubadas a 37 °C en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado hasta la saturación del cultivo. A partir de este cultivo se realizó el aislamiento de DNA plasmídico, utilizando el kit comercial Miniprep Puro Plásmido (Productos Bio-Lógicos), siguiendo las instrucciones detalladas por el proveedor.

6. Construcción de plásmidos

6.1.Construcción de los plásmidos *SKI3* RNAi1, *SKI3* RNAi2, *PSD1* RNAi y *PSD2* RNAi para silenciamiento

Para construir los plásmidos que permitan el silenciamiento post-transcripcional mediado por RNAi, se realizó la amplificación de fragmentos de entre 100 y 200 pares de bases de cada secuencia mediante PCR utilizando los *primers* detallados en la Tabla 4 y cDNA de *M. truncatula* Jemalong A17 como molde. El fragmento obtenido fue purificado y clonado en el vector *pENTR/D-TOPO*. Posteriormente, se realizó la recombinación sitio específica

entre el pENTR/D-TOPO conteniendo el fragmento de interés y el vector de destino pK7GWIWG2D(II), dando lugar a la formación de una repetición invertida de cada fragmento en el vector de destino, utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* DH5. Se aislaron los plásmidos recombinantes y se confirmó la identidad de la construcción por secuenciación.

7. Generación de plantas compuestas de *M. truncatula*

7.1.Preparación de células de *A. rhizogenes* Arqua1 electrocompetentes

Las células de *A. rhizogenes* Arqua1 se cultivaron en medio LB durante una noche a 28 °C con agitación. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 6.000 g durante 10 minutos. Una vez removido el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 ml de glicerol 10 % (v/v). Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, descartando luego el sobrenadante y resuspendiendo en 25 ml de glicerol 10 % (v/v). El mismo procedimiento se repitió reduciendo el volumen de solución de glicerol a 4 ml, llegando luego a la solución final en la que se resuspendió el producto de la centrifugación en 500 µl de glicerol 10 % (v/v). Finalmente se fraccionó en alícuotas de 40 µl, se colocaron los tubos rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

7.2.Transformación de células de *A. rhizogenes* Arqua1 electrocompetentes

Las células competentes se transformaron mediante un pulso de electroporación a 2,5 kV, durante 5 milisegundos, con una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 400 Ω, utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser (BioRad) y cubetas de electroporación de 2 mm de espesor estériles. En las cubetas se colocaron 40 µl de bacterias competentes previamente mezcladas con 1 µl del plásmido de interés e inmediatamente se procedió a la electroporación. Luego se agregó 1 ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se incubó 1 h a 28 °C para su recuperación. Finalmente, la suspensión de células fue centrifugada brevemente a 6000 g y resuspendida en 100 – 200 µl de medio, que fueron sembrados en

una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28 °C durante 24 horas.

7.3. Esterilización superficial y germinación de semillas

Las semillas de *M. truncatula* fueron escarificadas químicamente por tratamiento con H₂SO₄ 98% (v/v) y agitación hasta la aparición de puntos negros en las semillas. El H₂SO₄ fue removido y se realizaron cinco lavados con agua destilada a 4 °C. La esterilización se realizó incubando las semillas con hipoclorito de sodio 12 g/l durante 2 minutos seguido de seis lavados con agua destilada estéril. Para la germinación *in vitro*, las semillas fueron transferidas a placas de Petri conteniendo agar-H₂O 8% (p/v). Las placas se incubaron invertidas a 4 °C en oscuridad durante dos días para sincronizar la germinación y para el desarrollo de radículas rectas. Posteriormente, las placas fueron colocadas a 25 °C por aproximadamente 30 horas, permitiendo que las radículas alcancen la longitud adecuada para ser transferirlas a placas o potes, o para realizar la transformación mediante *A. rhizogenes*.

7.4. Transformación de raíces de *M. truncatula* mediada por *A. rhizogenes*

La transformación de *M. truncatula* se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la literatura (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Se creció un cultivo de la cepa de *A. rhizogenes* con la construcción de interés en medio agar-LB suplementado con antibiótico adecuado durante dos días a 28 °C. Una vez obtenidas las radículas de *M. truncatula* de la longitud adecuada, se seccionaron 3 mm desde la punta de la radícula y en el sitio de corte se inoculó con el cultivo de *A. rhizogenes* conteniendo la construcción de interés. Las plántulas inoculadas se colocaron en placas de petri (6 por placa) con medio agar-Fahraeus suplementado con KNO₃ y kanamicina para la selección de las raíces transgénicas. Posteriormente, las plantas se incubaron en posición vertical en una cámara Sanyo con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad, durante 7 días a 20 °C. Esta temperatura aumenta significativamente la eficiencia de transformación. Pasados siete días, las plantas fueron transferidas a 25 °C en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de una semana, las plántulas que desarrollaron raíces transgénicas fueron transferidas en condiciones de esterilidad a cajas de Petri cuadradas (dimensiones 12 cm x 12 cm x 1 cm) conteniendo medio Fahraeus-agar sin KNO₃ y papel estéril sobre

el medio para mantener la humedad o a potes conteniendo perlita-arena como sustrato en una relación 3:1.

8. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de las plantas compuestas

8.1. Inoculación de las raíces de *M. truncatula* con *S. meliloti*

La inoculación de las raíces de *M. truncatula* con *S. meliloti* se realizó siguiendo el protocolo reportado por Journet y colaboradores (Journet *et al.*, 2006). A partir de una estría de *S. meliloti* crecida en medio TY agar con estreptomicina 400 µg/ml, se inoculó un cultivo líquido de TY conteniendo el mismo antibiótico y se incubó a 28 °C con 200 rpm de agitación por 24 horas. Posteriormente, a partir de este cultivo se inoculó un cultivo fresco que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.6 y 0.8. Se utilizaron 20 ml de una dilución del cultivo de *S. meliloti* con una concentración de 1×10^3 bacterias/ml en medio *Fahraeus* para inocular las raíces crecidas en potes y 10 ml de una dilución de *S. meliloti* con una concentración de 5×10^5 bacterias/ml en agua destilada estéril para inocular las raíces crecidas en placas. Luego de la inoculación, las placas se mantuvieron en posición horizontal durante 1 hora, posteriormente se retiró el exceso de la suspensión y se incubaron en posición vertical.

8.2. Análisis de eventos de infección (ITs)

El análisis de los hilos de infección fue realizado mediante microscopía de epifluorescencia con un microscopio invertido IX51 Olympus (Olympus Corporation). Para esto, plantas compuestas de *M. truncatula* fueron crecidas en cajas de acrílico conteniendo agar *Fahraeus* sin nitrato durante 7 días y a continuación se inocularon con 5 ml de un cultivo de *S. Meliloti* 1021 que expresa constitutivamente la proteína fluorescente roja RFP. Luego de siete días se cuantificaron los eventos de infección de raíz y se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su progresión: ITs que solamente han crecido dentro del pelo radical, ITs que se penetran otras células de la epidermis e ITs que alcanzan el córtex de la raíz. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo.

8.3. Cuantificación del número y tamaño de los nódulos

Teniendo en cuenta que cada raíz de una planta compuesta es un evento de transformación independiente, se cuantificó el número de nódulos por raíz transgénica en las plantas compuestas crecidas en placas cuadradas de acrílico a 7, 10, 15 y 21 dpi con la cepa 1021 de *S. meliloti*. Para medir el tamaño de los nódulos se usaron plantas compuestas crecidas en potes con nódulos de 21 dpi. Los nódulos fueron fotografiados, incorporando una regla como escala. El largo de cada nódulo fue determinado utilizando la herramienta de medición del programa Adobe Photoshop v. 7.0. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6. Se calculó la media \pm el desvío estándar y se determinó la significancia estadística de los datos mediante un t-test no apareado de dos colas. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo.

8.4. Cuantificación de la longitud de las raíces

Plantas compuestas de *M. truncatula* fueron crecidas en placas cuadradas de acrílico conteniendo medio Fahraeus suplementado con KNO_3 . Luego de 10 días, se cuantificó manualmente la longitud de las raíces primarias (RPs) y de las raíces laterales (RLs). También se calculó la densidad de RLs como el número de RLs emergidas por centímetro de RP. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software GraphPad Prism v. 6. Se calculó la media \pm el desvío estándar y se determinó la significancia estadística de los datos mediante un t-test no apareado de dos colas. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo. Sobre estas mismas plantas se cuantificó la longitud de la parte aérea y el número de hojas de cada planta.

9. Purificación de polisomas mediante la técnica de TRAP

9.1. Recolección de tejido y extracción de polisomas

Se colectó el tejido de raíces que expresan la proteína de fusión FLAG-RPL18 y se pulverizó en N_2 líquido utilizando un mortero hasta obtener un polvo muy fino. Se utilizaron 5 ml de tejido en el caso de raíces que expresan P35S:FLAG-RPL18, 10 ml para PSUC2:FLAG-RPL18 y 15 ml para tejido proveniente de raíces transformadas con PCO2:FLAG-RPL18 o PEXP7:FLAG-RPL18. El tejido se mezcló con al menos dos

volúmenes de buffer de extracción de polisomas (PEB) y se dejaron descongelar en hielo. El buffer PEB fue preparado en el momento de su uso a partir de soluciones stock (Tabla 3). La mezcla se transfirió a homogenizadores de vidrio previamente esterilizados, y el homogenato obtenido se mantuvo por 10 minutos en hielo. Se realizó luego una centrifugación a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando Miracloth (Calbiochem) y se transfirió a un nuevo tubo. Luego de este paso se reservó una alícuota de la muestra para realizar la extracción de RNA total de raíz. El resto de la muestra se conservó en hielo hasta su incubación con el anticuerpo α -FLAG (Sigma) conjugado a Protein G Dynabeads.

9.2.Preparación de las bolillas magnéticas conjugadas a α -FLAG

Cincuenta μ l de Protein G Dynabeads se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se separaron las Protein G Dynabeads colocándolas en un imán durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavaron tres veces las bolillas magnéticas agregando 400 μ l de buffer de lavado y unión de bolillas (BWBB) (Tabla 3), mezclando hasta lograr una homogeneización completa y separando luego las bolillas del buffer de con el imán. Se adicionaron 5 μ l (1 μ g/ μ l) de anticuerpo monoclonal α -FLAG, se diluyeron con 400 μ l de buffer BWBB y se agregaron a las Protein G Dynabeads lavadas. Se incubó con agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se separaron magnéticamente las bolillas y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las bolillas conjugadas a α -FLAG y se agregaron 400 μ l de BWBB.

9.3.Purificación de polisomas.

Se separaron las Protein G Dynabeads conjugadas α -FLAG colocándolas en un imán durante 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las bolillas magnéticas conjugadas a α -FLAG en la muestra. Se incubó durante 2 horas a 4 °C con agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se colocaron los tubos en una gradilla magnética durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron cuatro lavados con 6 ml de buffer de lavado (WB) (Tabla 3), agitando manualmente durante 5 minutos en hielo. Se retiró el sobrenadante y se procedió inmediatamente a la extracción de RNA.

Tabla 3. Soluciones utilizadas en la técnica de TRAP

Solución Stock	Buffer PEB	Buffer WB	Buffer BWBB
Tris-HCl 2 M pH 9,0 ^a	Tris-HCl 200 mM pH 9,0	Tris-HCl 200 mM pH 9,0	Tris-HCl 200 mM pH 9,0
KCl 2 M ^a	KCl 200 mM	KCl 200 mM	KCl 200 mM
EGTA 0,5 M pH 8,0 ^a	EGTA 25 mM pH 8,0	EGTA 25 mM pH 8,0	EGTA 25 mM pH 8,0
MgCl ₂ 1 M ^a	MgCl ₂ 35 mM	MgCl ₂ 35 mM	MgCl ₂ 35 mM
Detergent mix 20 % ^{ab}	Detergent mix 1%	-----	-----
PTE 10 %	PTE 1 %	-----	-----
DTT 500 mM	DTT 1 mM	DTT 1 mM	-----
PMSF 100 mM ^c	PMSF 1 mM	PMSF 1 mM	-----
Cicloheximida 50 mg/ml ^d	Cicloheximida 50 µg/ml	Cicloheximida 50 µg/ml	-----
Cloranfenicol 50 mg/ml ^d	Cloranfenicol 50 µg/ml	Cloranfenicol 50 µg/ml	-----
-----	-----	-----	Tween-20 0,02 (v/v)

a. Soluciones autoclavadas.

b. La solución Detergent mix 20 % contiene Brij-35 20 % (p/v), Triton X-100 20 % (v/v), Igepal CA 630 20 % (v/v) y Tween- 20 20 % (v/v).

c. Solución preparada en isopropanol.

d. Solución preparada en etanol.

PTE: Polyoxyethylene Polyoxyethylene tridecyl ether.

DTT: Dithiothreitol.

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride.

10. Extracción y análisis de RNA

10.1.Extracción de RNA a partir de tejido de raíz

La recolección del tejido de raíces y nódulos se realizó a partir de plantas crecidas en potes o placas a distintos tiempos. El tejido se colectó en N₂ líquido y se pulverizó en mortero previniendo en todo momento la descongelación del mismo para evitar la acción de RNAsas. Se adicionó Trizol (Invitrogen) al tejido pulverizado según indicaciones del proveedor. La mezcla fue incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó la mezcla por 15 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 0,5 ml de isopropanol. Luego de mezclar suavemente, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado fue lavado con etanol 70 %. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 50 µl de H₂O y se incubó a 55 °C durante 10 minutos para ayudar a su disolución. El RNA fue conservado a -80 °C hasta su utilización. Para verificar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). La concentración de RNA se estimó a partir de la cuantificación de la absorbancia medida en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

10.2.Extracción de RNA a partir de muestras Total y TRAP

En el caso de las muestras de RNA Total, se adicionó Trizol a la muestra resuspendida luego de la centrifugación a 16.000 g (Sección 9.1. Recolección de tejido y extracción de polisomas). Se siguió luego el mismo procedimiento que en la sección 10.1. En el caso de las muestras TRAP, el Trizol fue adicionado directamente a la muestra unida a las bolillas magnéticas conjugadas a α -FLAG. Se siguió luego el mismo procedimiento que en la sección 9.1 pero en la precipitación con isopropanol se agregó también 1 µl de glucógeno 20 µg/µl (Invitrogen) y se incubó toda la noche a -20 °C.

10.3.Tratamiento con DNasa

Para eliminar la posible presencia de DNA genómico contaminante en las muestras se digirió 1 µg de RNA con una unidad de la enzima RQ1 DNasa libre de RNasa (Promega) en un volumen final de 10 µl. Se utilizó el buffer suministrado por el fabricante. Se incubó

durante 1 hora a 37 °C, luego se agregó 1 µl de la solución Stop (EDTA 20 mM, Promega) y se incubó durante 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

10.4. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA tratado con DNAsa. Se incubó cada muestra con oligodT y se calentó a 70 °C por 5 min, seguido del agregado de 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Promega), dNTPs 0,5 mM y buffer 1X (Promega), en un volumen final de 25 µl con agua estéril. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 42 °C. Finalmente se ajustó el volumen a 200 µl y se almacenaron en freezer a -20 °C hasta su utilización.

En el caso de la síntesis de cDNA bacteriano, se incubó la muestra con *random primers*. Luego se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis de cDNA eucariota.

10.5. Ensayos de PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones para medir los niveles de expresión relativos de los genes seleccionados se llevaron a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real (CFX 96 Real Time System C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad), utilizando como molde 5 µl de una dilución 1/10 del cDNA sintetizado. Las etapas de reacción fueron: 5 minutos a 95 °C, 44 ciclos de 23 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 20 segundos a 72 °C. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl con una concentración de 0,5 µM de cada oligonucleótido, y 1 X del buffer iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Se verificó la amplificación de un solo fragmento mediante la inclusión de una cuRa de *melting* utilizando el programa provisto con el instrumento. La normalización de los datos fue realizada mediante la amplificación de fragmentos correspondientes al gen *Histona 3* (Medtr4g097170.1, Andriankaja *et al.*, 2007). Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad v 6.0. Se realizaron controles negativos usando agua bidestilada estéril en reemplazo del cDNA.

10.6. Ensayo de 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Para detectar los transcritos producidos por el locus de *PSD* se llevó a cabo un ensayo 3' RACE utilizando el kit 3' RACE *System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen). Se sintetizó la primer hebra de cDNA a partir de RNA total libre de gDNA utilizando el *primer AP (Adapter Primer)* siguiendo el protocolo provisto por Invitrogen.

Luego se realizó una amplificación mediante PCR utilizando los *primers* PSD2 F y UAP (*Universal Amplification Primer*). Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5 % (p/v).

11. Tinción y microscopia

11.1. Microscopía electrónica

Para obtener secciones ultrafinas de los nódulos de 28 días de plantas de *M. truncatula* crecidas en potes, se utilizó el servicio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los nódulos fueron fijados en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4, conteniendo glutaraldehído 2 % (v/v), durante 2 horas a 4 °C, y luego remitidos al servicio de microscopía. Las secciones de 70 nm se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL).

11.2. Microscopía confocal

Se realizó microscopía confocal sobre tejidos de raíz y nódulos inoculados con *S. meliloti* que expresa RFP a diferentes tiempos de la interacción simbiótica. Se utilizó un microscopio confocal SP5 invertido (Leica Microsystems). GFP y RFP se excitaron utilizando láseres de 488 nm y 543 nm, y las emisiones se recogieron entre 498-552 nm y 578-626 nm, respectivamente. Las imágenes se procesaron con el software LAS Image Analysis (Leica Microsystems).

11.3. Tinción Syto9 / IP

Se extrajeron nódulos individuales de plantas cultivadas en potes conteniendo perlita:arena (3:1) a 11, 14 ó 28 dpi con *S. meliloti* 1021. Se embebieron las muestras en agarosa de bajo punto de fusión (para mantener la viabilidad de las bacterias) a una concentración de 6% (p/v). Se cortaron secciones de nódulos de 60 µm utilizando un Vibratome Leica VT1000 S (Leica Microsystems). La tinción de las bacterias se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando SYTO9 5 µM e yoduro de propidio 30 µM. Las muestras se observaron en un microscopio confocal SP5 invertido (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron con el software LAS Image Analysis.

12. Preparación de bibliotecas de GMUCT 2.0

Como material biológico de partida para la construcción de las bibliotecas GMUCT 2.0 se utilizaron raíces de plantas *GUS* RNAi y *SKI3* RNAi1 inoculadas con *S.meliloti* o con agua como control. Se realizaron tres réplicas biológicas. Las bibliotecas se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Willmann *et al.* 2014, reemplazando componentes de kits por materiales disponibles localmente. El RNA se extrajo utilizando Trizol (Sección 10.1). Se utilizaron 30 µg de RNA de cada muestra para obtener RNA Poly-A utilizando Dynabeads™ Oligo(dT), (Termo Fisher Scientific). Se utilizó T4 RNA ligasa (New England Biolabs) para ligar un adaptador 5' a los extremos de los RNAs que poseen un 5' monofosfato libre y se realizó una segunda ronda de obtención de RNA Poly-A utilizando Dynabeads™ Oligo(dT) para descartar el exceso de adaptador 5'. Se ligó un adaptador 3' y, luego de la síntesis de DNA complementario utilizando la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), las bibliotecas fueron amplificadas por PCR utilizando KAPA HiFi DNA Polymerase (Kapa Biosystems) y *primers* de BrAD-seq (Townesley *et. al.*, 2015). Los fragmentos de PCR se purificaron usando AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics). El tamaño de los fragmentos de DNA se verificó en un Agilent bioanalyzer 2100 utilizando el kit DNA-1000 (Agilent). Las bibliotecas se secuenciaron en un equipo Illumina HiSeq 2500 en las instalaciones del IIGB Genomics Core UC Riverside (<https://genomics.iigb.ucr.edu/>).

13. Análisis bioinformáticos

13.1. Análisis bioinformáticos generales

-Análisis general de secuencias y diseño de *primers*

Las secuencias de los vectores utilizados y los marcos abiertos de lectura fueron analizados mediante el software Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). El diseño de *primers* fue realizado usando Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

-Bases de datos de secuencias genómicas

Se utilizaron las bases de datos genómicas de *M. truncatula* versión Mt4.0 (Young *et al.*, 2011), disponible públicamente a través de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y *Medicago truncatula* A17 r5.0 (Pecrix *et*

al., 2018), (<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/>). En el caso de miRNAs se utilizó la base de datos miRBASE (<http://www.mirbase.org/>).

-Base de datos de expresión

Se utilizó la base de datos *M. truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA) (<http://mtgea.noble.org>) para analizar los perfiles de expresión del gen *SKI3* de *M. truncatula* (Benedito *et al.*, 2008).

-Identificación de dominios en SKI3, LSD1 y RDM4

Las secuencias de las proteínas SKI3, LSD1 y RDM4 fueron utilizadas para realizar una búsqueda de dominios proteicos en la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

-Diagramas de Venn

Para realizar los diagramas de Venn se utilizó la herramienta web *Calculate and draw custom Venn diagrams*, disponible en el portal de la universidad de Gent (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). El programa genera el diagrama mostrando la superposición de elementos, así como también tablas mostrando los elementos compartidos y únicos entre categorías.

-Análisis del potencial codificante

Para clasificar los genes no anotados como codificantes de proteínas o no codificantes (ncRNAs), se utilizaron los algoritmos computacionales Coding Potential Calculator (CPC) (<http://cpc.cbi.pku.edu.cn>) (Kong *et al.*, 2007) y Coding Potential Assessment Tool (CPAT) (<http://lilab.research.bcm.edu/cpat>) (Wang *et al.*, 2013).

-BLAST

Las secuencias de lncRNAs fueron analizadas utilizando la herramienta BLASTX y BLASTP (www.ncbi.nlm.nih.gov). La secuencia de *PSD* obtenida mediante los datos de RNA y TRAP-seq fue utilizada como *query* en una búsqueda contra la base de datos genómica *Medicago truncatula* A17 r5.0, utilizando la herramienta *Short Nucleotide Sequence-Nucleotide Blast* disponible en el *Medicago truncatula* A17 r5.0 genome portal

(Pecrix *et al.*, 2018) (<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/>), que permite el alineamiento de secuencias cortas e imperfectas.

-Análisis de ORFs

Los ORFs en los lncRNAs se predijeron usando la herramienta Open Reading Frame Finder disponible en el portal ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) y el programa Sequence Manipulation Suite ORF Finder (Stothard, 2000) (<http://www.bioinformatics.org>).

13.2. Procesamiento y análisis de los datos de RNA Total y TRAP-seq

El análisis informático fue llevado a cabo a través de la interfase GALAXY (Blankenberg *et al.*, 2010; Blankenberg and Hillman-Jackson, 2014). La primera etapa del análisis consistió en convertir el formato fastq, provisto por el servicio de secuenciación, al formato fastq Sanger con la opción Groomer de GALAXY, permitiendo obtener un formato estándar fastq compatible con el software de análisis. La calidad de las secuencias fue verificada utilizando la herramienta FastQC. Esta herramienta calcula una serie de parámetros que permiten determinar si la calidad y confiabilidad de las secuencias provistas es aceptable. Los parámetros calculados son: valor medio de Q para cada base, índice de calidad por secuencia, el contenido de GC por secuencia, el porcentaje de cada nucleótido para cada posición en las secuencias, el contenido de bases no identificadas (N) por secuencia, la distribución de tamaños de las secuencias, cantidad de secuencias duplicadas, y la existencia de secuencias y Kmers sobrerrepresentadas. Todos estos parámetros superaron los estándares de calidad esperados para el tipo de secuenciación realizado. El alineamiento de las lecturas de RNA-Seq con el genoma de referencia *M. truncatula* versión Mt4.0 (Young *et al.*, 2011) se realizó utilizando el programa TopHat2 (Kim *et al.*, 2013), modificando el parámetro de longitud máxima y mínima de los intrones a 60 y 6000 pb, recomendable para genomas de plantas (Márquez *et al.*, 2012; Dalla Via *et al.*, 2015). Los archivos generados fueron luego analizados con el paquete de análisis Cufflinks, que consta de tres herramientas: Cufflinks, Cuffmerge y Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2012; Trapnell *et al.*, 2013). La herramienta Cufflinks permitió ensamblar y medir la abundancia relativa de los genes y transcriptos para cada condición. Seguidamente, los transcriptos ensamblados fueron combinados con la herramienta Cuffmerge y analizados

con la herramienta Cuffdiff para detectar transcritos con expresión diferencial. Cuffdiff genera diferentes archivos, entre ellos archivos que indican la abundancia de los transcritos. Esta herramienta permite estimar los valores de FPKM (por *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*) para cada transcrito en cada una de las muestras, permitiendo encontrar diferencias significativas en la expresión de transcritos. Las tablas obtenidas fueron combinadas con la anotación funcional obtenida del sitio genómico utilizando la herramienta “*Join two datasets*” disponible a través de GALAXY. La visualización de lecturas alineadas al genoma de referencia se realizó utilizando el software libre Integrative Genome Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>).

13.3. Procesamiento y análisis de los datos de GMUCT 2.0-seq

Las lecturas de GMUCT se alinearon al genoma de referencia de *M. truncatula* versión Mt4.0 (Tang *et al.*, 2014) utilizando el programa TopHat2 (Kim *et al.*, 2013), reportando el mejor alineamiento con ≤ 2 nt *mismatches*. Los picos se detectaron con la función “*Findpeaks*” del paquete HOMER (Heinz *et al.*, 2010) con los parámetros “*-regionRes 1*”, “*-minDist 150*” y “*-region*”. Los picos que mostraron superposición en al menos dos réplicas se consenaron para el análisis posterior utilizando la función “*findOverlapsOfPeaks*” del paquete ChipPeakAnno R (Zhu *et al.*, 2010). Las lecturas en los picos se cuantificaron para cada réplica utilizando la función “*resumizeOverlaps*” del paquete GenomicRanges R (Lawrence *et al.*, 2013). Las secuencias de miRNAs se obtuvieron de la base de datos miRbase (<http://www.mirbase.org>) y los sitios de corte de los miRNAs sobre los posibles *targets* en el genoma fueron estimados utilizando el software Miranda (Enright *et al.*, 2003). La cantidad de lecturas de picos y sitios de corte se evaluaron estadísticamente utilizando DESeq2.

Anexo 1. Primers

Tabla 4: *Primers* utilizados en este trabajo.

Gen ID	Nombre del gen	Nombre del primer	Secuencia del primer	Referencia
Medtr7g085810	<i>Ethylene response factor (ERN) required for Nodulation 1 (ERN1)</i>	ERN1 F	GGAAGATGGTGTGTTGCTT	Andriankaja et al., 2007
		ERN1 R	TGTTGGATTGTGAACCTGACTC	
Medtr1g056530	<i>Nuclear factor Y-A1 (NF-YA1)</i>	NF-YA1 F	AAAATATGGCTATGCAACCTGTTTA	Combiar et al., 2006
		NF-YA1 R	CAACTGACATCTTACAATCATCTGG	
Medtr5g061290	<i>Seven in absentia (SINA)</i>	SINA F	AGTCAGCCATCTTCTCGTCTTTTCG	Traubenik et al., 2019
		SINA R	CGATGGCGCGGATGATGAGG	
Medtr7g052020	<i>Cysteine-rich receptor like kinase (Cys-rich RLK)</i>	CYS F	ACCAAAACAAGACCTTCTAAAATAGGAAAGG	Traubenik et al., 2019
		CYS R	TGATCCCTGCATAGTTTGAGTAATACATACA	
Medtr6g021615	<i>Nodule-specific cysteine-rich (NCR)</i>	NCR F	CCGAAGTGTGTTTCACATATTTGCTTCTGT	Tesis doctoral Dr. Mauricio Reynoso
		NCR R	GCTTGTGCGAGCTTAAAGGTTTGACTTGA	
Medtr3g08320	<i>Nodule pectate lyase (NPL)</i>	NPL F	CTAGCTCCAGATGATGATGACCACA	Tesis doctoral Dr. Mauricio Reynoso
		NPL R	GTTAATTGTTTCTCGGAACAGTGATACCA	
Medtr1g083460	<i>Ribosomal protein large subunit 18 (RPL18)</i>	RPL18 F	CACCGGTATCGATCTTAAGGCAGGAGG	Reynoso et al., 2013
		RPL18 R	TCAAACCTGGAATCCTCTGCTCTTC	
Medtr4g097170	<i>HISTONE LIKE 3 (HISL3)</i>	HIS3 F	ATTCAAAGGCGGCTGCATA	Ariel et al., 2010
		HIS3 R	CTTTGCTTGGTGTGTTAGATGG	
Medtr2g008050	<i>ACTINE 11 (ACT11)</i>	ACT F	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG	Ariel et al., 2010
		ACT R	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC	
Medtr4g072190	<i>Small auxin up-regulated RNA (SAUR)</i>	SAUR90 F	GGTGATGATGAGGCTTGCAATT	Traubenik et al., 2019
		SAUR90 R	GACACGATCAAACAAATATCTCTCACAGG	
Medtr8g026730	<i>Small auxin up-regulated RNA (SAUR)</i>	SAUR30 F	CAATCACCTCTTTTCATTCAACTA	Traubenik et al., 2019
		SAUR30 R	AGAAATTTACATGACCAAATCATTGC	
Medtr1g094740	<i>Histone lysine specific demethylase (LSD1)</i>	LSD1 F	ATCACCTGAGGTAGTTGTTG	Este trabajo
		LSD1 R	GGCTGAATCCTACATGATAA	
		LSD1Sp F	CAC CTG AGG TAG TTG TTG CAT CTG	

		LSD1Sp R	GCT GAT GGG AGA GCA TAG GAA GAT	
Medtr7g033685	<i>RNA-Directed DNA Methylation 4 (RDM4)</i>	RDM4 F	CATTTGAGAGGTCATTTTCACA	Este trabajo
		RDM4 R	CATTTGAGAGGTCATTTTCACA	
Medtr5g004660	<i>Superkiller3</i>	SKI3 F	GCATATGCAAGATGTAATCC	Traubenik et al., 2019
		SKI3 R	ATGGAGACAAGTGTAATGCT	
		SKI3RNAi F	CACCGGAACAAGT TTCACGATAGGGAGT	
		SKI3RNAi R	CGTCTTTGTTTGTCTCGAGTACGA	
		SKI3RNAi2 F	CACCGCAAGATGTAATCCTTGGATTGA	
		SKI3RNAi2 R	CATGGAAGACAAGTGTAATGCTCGT	
	<i>Nitrogenase iron protein</i>	NifH F	GCCTCAATTCCAAGCTCATC	Cedido por el Dr. Antonio Lagares
		NifH R	ATTCCAAAGTCGAGCAGCAT	
	<i>Octopina sintasa</i>	3' OCS R	CATGCGATCATAGGCGTCTCG	Mazziotta et al., 2012
	<i>Sensory histidine kinase/phosphatase NtrB</i>	ntrB F	CCGACCGGATCGAAATCA	Becker et al., 2007
		ntrB R	TCGTGTGCAGGATGCTGATG	
Medtr5g099060	<i>Nodule inception protein</i>	NIN F	GAAGCCATGACTATCCGCGTC	Smit et al., 2007
		NIN R	CACCACAACCTGATGCACCAC	
X80264.1	<i>Early nodulin 40</i>	ENOD40 F	AGGAATCCATTGCCTTTTTGTGAC	Gonzalez-Rizzo et al., 2006
		ENOD40 R	CCCTACACACTCTCCCTCCA	
Medtr4g061200	<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor</i>	AP2 F	GGAGATCTGTTGCCGTTAGGTG	Traubenik et al., 2019
		AP2 R	GCAACCTCATGGCCTTGTCAC	
	3' RACE	Adapter Primer (AP)	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Invitrogen
		Universal Amplification Primer (UAP)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
Medtr1gNC01400	<i>lncRNA1400</i>	LNC1400 F	CACCGCATTTCACAACCCAGGCT	Traubenik et al., 2019
		LNC1400 R	GTCTCGGTCGGATGTGGAA	
Medtr1NC011391	<i>lncRNA11391</i>	LNC11391 F	GCCGCTTCAATGGGATCTCT	Traubenik et al., 2019
		LNC11391 R	CACCGACCTAGTCCCCTCTCTTGTGT	
Medtr4NC044596	<i>lncRNA44596</i>	LNC44596 F	CACCAACGTACCCTCACATATCT	Traubenik et al., 2019
		LNC44596 R	GGATTGCCCTCTTAGTGTCT	
Medtr3NC032155	<i>POSEIDON</i>	PSD1 F	CACCGGGCACATAACAACCTTCATCACCT	Traubenik et al., 2019
		PSD1 R	GACCTAGTCCCCTCTCTTGTGT	
		PSD2 F	CACCGGGCACATAACAACCTTCATCACCT	Este trabajo

		PSD2 R	GACCTAGTCCCCTCTCTTGTGT	
		N1 F	CCT TCC TCA CTC CCT GCT AT	
		OXPSD F	CACCTCTAGATGTTTCTTCTGAGTGGATAACTCTC	
		OXPSD R	CTAAATCAAACCCAACCTTATCTACAGACATG	

Anexo 2. Abreviaturas

A: absorbancia
ABP: Auxin Binding Protein
ACT11: ACTINA11
AGN: Agenet domain protein
AGO: argonauta
AP: adapter primer
AP2: APETALA 2
APA: Alternative Polyadenylation
ATP: adenosina tri-fosfato
ATSS: sitio de inicio de la transcripción alternativo
bHLH: factores de transcripción del tipo basic Helix loop hélix
BWBB: buffer de lavado y unión de bolillas
CaMV 35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
Cap: 5' m7GpppN
CBP: cap binding protein
cDNA: DNA complementario
CER7: ECERIFERUM7
CO2: Cortex specific transcript
CPAT: Coding Potential Assesment Tool
CPC: coding potential calculator
CRE: cytokin response element
CYC: cyclin
DCP: decapping protein
DMI: gen does not make infections
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
Dpi: días post-inoculación
DRM: domain rearranged methyltransferase
dsRNA: RNA doble cadena
DTT: ditioneitol
DXR: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
EGTA: ácido etilen glicol bis (β aminoetil-éter)-N, N', N', tetraacético
eIF: eukaryotic initiation factor
EIN: Ethylene Insesitive
ELF: Early Flowering
EMS: metanosulfonato de etilo

ENOD: Early Nodulin
ERF: Ethylene Response Factor
ERN: Ethylene Response Factor Required for Nodulation
EV: empty vector
EXP: expansina
FC: fold change
FLAG: péptido DYKDDDDK
FLC: Flowering Locus C
FPKM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
gDNA: DNA genómico
GDP: guanosina di-fosfato
GED: gen expresado diferencialmente
GFP: green fluorescent protein
GO: gene ontology
GRAS: Giberellic acid-Insensitive (GAI), Repressor of GAI (RGA) and Scarecrow (SCR)
GTP: guanosina tri-fosfato
GUS: β -glucuronidasa
HF: epitope dual His-FLAG
His: epitope de histidinas
HIS3L: histona3
Hpi: horas post-inoculación
IGV: Integrative Genome Viewer
IPD3: interacting protein of dmi3
IT: infection thread
JAS: jasmonate zim-domain protein
Jmj: jumonji
Kb: kilobase
KTN: knotted 1-binding protein
LB: borde izquierdo del T-DNA
lincRNA: RNA no codificante largo intergénico
lncRNA: RNA no codificante largo
LRR: leucine rich repeat
LSD1: histone lysine-specific demethylase 1
LTP: Lipid Transfer protein
LYK3: LysM receptor like kinase 3
Mbp: millones de pares de bases
MCM: minichromosome maintenance family protein
miRNA: micro RNA
mock: inoculación con agua

MPM: marcador de peso molecular
mRNA: RNA mensajero
NAT: Natural Antisense Transcript
NCR: Nodule cysteine-rich peptide
ncRNA: RNA no codificante
NF: nod factor
NFP: nod factor perception
NF-Y: nuclear factor Y
NGD: no-go decay
NIN: nodule inception
NMD: non-sense mediated decay
NNC1: Nodule Number Control 1
NSD: non-stop decay
NSP: nodule signalling pathway
nts: nucleótidos
ocs: octopina sintasa
ORF: open reading frame
P-170: precipitado de 170.000 xg
PABP: polyA binding protein
Pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEB: buffer de extracción de polisomas
PG: polisomas grandes
PMSF: fenilmetil sulfonil fluoruro
PP: polisomas pequeños
pre-mRNA: precursor de mRNA
PSD: Poseidon
PTE: polyoxoetilen-10-tridecil eter
PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing
PUB: Plant U-box protein
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RACE: rapid amplification of cDNA ends
RB: borde derecho del T-DNA
RBP: RNA binding protein
RDM: RNA-Directed DNA Methylation
RDR: RNA polimerasa dependiente de RNA
RFP: red fluorescent protein
RIP: RNA immunopurification
RISC: RNA-induced silencing complex
RL: Ribosome loading

RLK: receptor like kinase
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RNA-seq: secuenciación masiva de RNA
RNP: complejo ribonucleoproteico
RP: proteína ribosomal
RPL: proteína ribosomal de la subunidad mayor
RPM: reads permillón reads
RR: reguladores de respuesta a citoquininas
rRNA: ácido ribonucleico ribosomal
RRP: ribosomal RNA processing protein
RT: transcripción reversa
S: Sverberg
S-16: sobrenadante a 16.000 xg
S-170: sobrenadante a 170.000 xg
SAUR: Small Auxin Up regulated
SEM: standard error of de mean
siRNA: small interfering RNA
SKI: superkiller
sncRNA: small non-coding RNA
snoRNA: RNA nucleolar
snRNA: RNA nuclear
sORF: small open reading frame
sRNA: small RNA
SUC2: transportador de sacarosa 2
SURP: SURP and G-patch domain protein
TAS: transcripto no codificante del que derivan tasiRNAs
tasiRNA: trans acting small interfering RNA
TBE: tris buffer EDTA
TBS: tris buffer salino
T-DNA: DNA de transferencia de la planta
TED: transcripto expresado diferencialmente
TF: factor de transcripción
TILLING: Target Induced Lessions in Genomes
TRAP: Translating Ribosome Affinity Purification
tRNA: RNA de transferencia
TSS: sitio de inicio de la transcripción
UAP: universal amplification primer
Uchl1: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
uORF: marco abierto de lectura previo al ORF principal

UTR: untranslated region

UV: luz ultravioleta

WB: buffer de lavado

xg: veces de gravedad

α -KG: α -cetoglutarato

Bibliografía

- Anderson, D.M., Anderson, K.M., Chang, C.-L., Makarewich, C.A., Nelson, B.R., McAnally, J.R., Kasaragod, P., Shelton, J.M., Liou, J., and Bassel-Duby, R. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* 160, 595-606.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* 19, 2866-2885.
- Ané, J.-M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ajax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J.-M., Kalo, P., et al. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* 303, 1364-1367.
- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichanté, J.L., and Chabaud, M. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 24, 3838-3852.
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., and Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *The Plant Cell* 22, 2171-2183.
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., and Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular cell* 55, 383-396.
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jégu, T., Benhamed, M., and Crespi, M. (2015). Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *Trends in plant science* 20, 362-371.
- Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J., and Song, H. (2013). Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 580-589.
- Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., et al. (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142, 265-279.
- Bailey-Serres, J., Sorenson, R., and Juntawong, P. (2009). Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci* 14, 443-453.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell* 136, 215-233.
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Goldstein, D.B., and Patel, N.H. (2007). *Evolution*. (Cold Spring Harbor Press).
- Basbouss-Serhal, I., Soubigou-Taconnat, L., Bailly, C., and Leymarie, J. (2015). Germination potential of dormant and nondormant *Arabidopsis* seeds is driven by distinct recruitment of messenger RNAs to polysomes. *Plant Physiology* 168, 1049-1065.
- Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Rípodas, C., Ariel, F., Frances, L., Crespi, M., Gamas, P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel A. (2015). A

- phylogenetically conserved group of nuclear factor-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes. *Plant physiology* 169, 2761-2773.
- Bazin, J., Baerenfaller, K., Gosai, S.J., Gregory, B.D., Crespi, M., and Bailey-Serres, J. (2017). Global analysis of ribosome-associated noncoding RNAs unveils new modes of translational regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E10018-E10027.
- Bazzini, A.A., Johnstone, T.G., Christiano, R., Mackowiak, S.D., Obermayer, B., Fleming, E.S., Vejnár, C.E., Lee, M.T., Rajewsky, N., and Walther, T.C. (2014). Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *The EMBO journal* 33, 981-993.
- Bénaben, V., Duc, G., Lefebvre, V., and Huguet, T. (1995). TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiology* 107, 53-62.
- Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., et al. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 55, 504-513.
- Blankenberg, D., and Hillman-Jackson, J. (2014). Analysis of next-generation sequencing data using Galaxy. In *Stem cell transcriptional networks*. (Springer), pp 21-43.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., and Team, G. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* 26, 1783-1785.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 695-700.
- Bonasio, R., and Shiekhattar, R. (2014). Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annual review of genetics* 48, 433-455.
- Booy, E.P., McRae, E.K., Koul, A., Lin, F., and McKenna, S.A. (2017). The long non-coding RNA BC200 (BCYRN1) is critical for cancer cell survival and proliferation. *Molecular cancer* 16, 109.
- Branco-Price, C., Kaiser, K.A., Jang, C.J., Larive, C.K., and Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56, 743-755.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R.B., and Bailey-Serres, J. (2005). Genome-wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in *Arabidopsis* Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation. *Annals of Botany* 96, 647-660.
- Branscheid, A., Marchais, A., Schott, G., Lange, H., Gagliardi, D., Andersen, S.U., Voinnet, O., and Brodersen, P. (2015). SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research* 43, 10975-10988.
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K.S., Wen, J., and Oldroyd, G.E. (2014). The root hair “infectome” of *Medicago truncatula*

uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *The Plant Cell* 26, 4680-4701.

Brown, J.T., and Johnson, A.W. (2001). A cis-acting element known to block 3' mRNA degradation enhances expression of polyA-minus mRNA in wild-type yeast cells and phenocopies a ski mutant. *Rna* 7, 1566-1577.

Browning, K.S., and Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 13.

Capela, D., Filipe, C., Bobik, C., Batut, J., and Bruand, C. (2006). Sinorhizobium meliloti differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Molecular plant-microbe interactions* 19, 363-372.

Caponigro, G., and Parker, R. (1995). Multiple functions for the poly (A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes & development* 9, 2421-2432.

Cardenas, L., Holdaway-Clarke, T.L., Sanchez, F., Quinto, C., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol* 123, 443-452.

Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., and Santoro, C. (2012). Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* 491, 454-457.

Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics* 14, 100.

Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *The Plant Cell* 12, 1647-1666.

Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F. (2012). *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiology* 160, 2155-2172.

Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F., and Barker, D. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant cell reports* 22, 46-51.

Chantarachot, T., and Bailey-Serres, J. (2018). Polysomes, stress granules, and processing bodies: a dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. *Plant physiology* 176, 254-269.

Charon, C., Johansson, C., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Crespi, M. (1997). enod40 induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8901-8906.

Charon, C., Sousa, C., Crespi, M., and Kondorosi, A. (1999). Alteration of enod40 expression modifies *medicago truncatula* root nodule development induced by *sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 11, 1953-1966.

- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A.-A., Sanders, D., and Morris, R.J. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 352, 1102-1105.
- Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2004). Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 5, 855-867.
- Chekanova, J.A. (2015). Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Current opinion in plant biology* 27, 207-216.
- Chew, G.-L., Pauli, A., Rinn, J.L., Regev, A., Schier, A.F., and Valen, E. (2013). Ribosome profiling reveals resemblance between long non-coding RNAs and 5' leaders of coding RNAs. *Development* 140, 2828-2834.
- Cogoni, C., and Macino, G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current opinion in genetics & development* 10, 638-643.
- Coller, J.M., Gray, N.K., and Wickens, M.P. (1998). mRNA stabilization by poly (A) binding protein is independent of poly (A) and requires translation. *Genes & development* 12, 3226-3235.
- Combier, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., et al. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* 20, 3084-3088.
- Complainville, A., Brocard, L., Roberts, I., Dax, E., Sever, N., Sauer, N., Kondorosi, A., Wolf, S., Oparka, K., and Crespi, M. (2003). Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *medicago* species. *Plant Cell* 15, 2778-2791.
- Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Current opinion in genetics & development* 14, 218-226.
- Crespi, M., and Galvez, S. (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *J Plant Growth Regul* 19, 155-166.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (1994). *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* 13, 5099-5112.
- Dalla Via, V., Narduzzi, C., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A. (2015). Changes in the common bean transcriptome in response to secreted and surface signal molecules of *Rhizobium etli*. *Plant physiology* 169, 1356-1370.
- de Bang, T.C., Lundquist, P.K., Dai, X., Boschiero, C., Zhuang, Z., Pant, P., Torres-Jerez, I., Roy, S., Nogales, J., and Veerappan, V. (2017). Genome-wide identification of *Medicago* peptides involved in macronutrient responses and nodulation. *Plant Physiology* 175, 1669-1689.
- de Lorenzo, L., Sorenson, R., Bailey-Serres, J., and Hunt, A.G. (2017). Noncanonical alternative polyadenylation contributes to gene regulation in response to hypoxia. *The Plant Cell* 29, 1262-1277.

- de Sousa Araújo, S., Duque, A.S.R.L.A., Dos Santos, D.M.M.F., and Fevereiro, M.P.S. (2004). An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant cell, tissue and organ culture* 78, 123-131.
- Deal, R.B., and Henikoff, S. (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Current opinion in plant biology* 14, 116-122.
- Deforges, J., Reis, R.S., Jacquet, P., Sheppard, S., Gadekar, V.P., Hart-Smith, G., Tanzer, A., Hofacker, I.L., Iseli, C., and Xenarios, I. (2019). Control of cognate sense mRNA translation by cis-natural antisense RNAs. *Plant physiology* 180, 305-322.
- d'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., and Ratet, P. (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 34, 95-106.
- Dorcey, E., Rodriguez-Villalon, A., Salinas, P., Santuari, L., Pradervand, S., Harshman, K., and Hardtke, C.S. (2012). Context-dependent dual role of SKI8 homologs in mRNA synthesis and turnover. *PLoS genetics* 8.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256, 998-1000.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85, 673-681.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., et al. (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* 136, 3159-3176.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417, 962-966.
- Engstrom, E.M., Ehrhardt, D.W., Mitra, R.M., and Long, S.R. (2002). Pharmacological Analysis of Nod Factor-Induced Calcium Spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the Requirement of Type IIA Calcium Pumps and Phosphoinositide Signaling. *Plant Physiology* 128, 1390-1401.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome biology* 5, R1.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Diaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., Sanchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., et al. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 1385-1393.
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16, 374-381.
- Fisher, A.J., and Beal, P.A. (2018). Structural basis for eukaryotic mRNA modification. *Current opinion in structural biology* 53, 59-68.

- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., and Link, A.J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes & Development* 20, 1294-1307.
- Fournier, J., Timmers, A.C.J., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G. (2008). Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiology* 148, 1985-1995.
- Galli, V., Guzman, F., de Oliveira, L.F., Loss-Morais, G., Koerbes, A.P., Silva, S.D., Margis-Pinheiro, M.M., and Margis, R. (2014). Identifying microRNAs and transcript targets in *Jatropha* seeds. *PloS one* 9.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306, 1046-1048.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., and Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137, 1228-1235.
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 2669-2673.
- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 346-352.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 10, 94-108.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., and Walker, G.C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual review of genetics* 42, 413-441.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18, 2680-2693.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131, 872-877.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., et al. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22, 2509-2526.
- Guttman, M., Russell, P., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Lander, E.S. (2013). Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell* 154, 240-251.
- Gy, I., Gascioli, V., Laressergues, D., Morel, J.-B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H., and Mallory, A.C. (2007). *Arabidopsis* FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *The Plant Cell* 19, 3451-3461.

- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., and Conti, E. (2013). The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* 154, 814-826.
- Halbeisen, R.E., and Gerber, A.P. (2009). Stress-Dependent Coordination of Transcriptome and Translatome in Yeast. *PLoS Biol* 7, e105.
- Hawkes, E.J., Hennelly, S.P., Novikova, I.V., Irwin, J.A., Dean, C., and Sanbonmatsu, K.Y. (2016). COOLAIR antisense RNAs form evolutionarily conserved elaborate secondary structures. *Cell reports* 16, 3087-3096.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *The Plant Journal* 63, 141-154.
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K. (2009). The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC bioinformatics* 10, 441.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Liu, H.-L., Pontes, O., Zhu, J., Cui, X., Wang, C.-S., and Zhu, J.-K. (2009). A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. *Genes & development* 23, 2717-2722.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular cell* 38, 576-589.
- Heo, J.B., and Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331, 76-79.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21, 545-557.
- Hobecker, K.V., Reynoso, M.A., Bustos-Sanmamed, P., Wen, J., Mysore, K.S., Crespi, M., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E. (2017). The microRNA390/TAS3 pathway mediates symbiotic nodulation and lateral root growth. *Plant physiology* 174, 2469-2486.
- Hofmann, N. (2014). No Scalpel Needed: Translatome of Pollen Tubes Growing within the Flower in *Arabidopsis*. *Am Soc Plant Biol*.
- Horváth, B., Yeun, L.H., Domonkos, Á., Halász, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miró, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., et al. (2011). *Medicago truncatula* IPD3 Is a Member of the Common Symbiotic Signaling Pathway Required for Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 1345-1358.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Yates, J.R., Schieltz, D., and Sachs, A.B. (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *Rna* 8, 948-958.
- Ingolia, N.T., Brar, G.A., Rouskin, S., McGeachy, A.M., and Weissman, J.S. (2013). Genome-wide annotation and quantitation of translation by ribosome profiling. *Current protocols in molecular biology* 103, 4.18. 11-14.18. 19.

- Jabnourne, M., Secco, D., Lecampion, C., Robaglia, C., Shu, Q., and Poirier, Y. (2013). A rice cis-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. *The Plant Cell* 25, 4166-4182.
- Jardinaud, M.-F., Boivin, S., Rodde, N., Catrice, O., Kisiala, A., Lepage, A., Moreau, S., Roux, B., Cottret, L., and Sallet, E. (2016). A laser dissection-RNaseq analysis highlights the activation of cytokinin pathways by Nod factors in the *Medicago truncatula* root epidermis. *Plant physiology* 171, 2256-2276.
- Jiao, Y., and Meyerowitz, E.M. (2010). Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol Syst Biol* 6, 419.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., and Gianinazzi-Pearson, V. (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 737-748.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., and Barker, D.G. (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* 6, 241-249.
- Juntawong, P., and Bailey-Serres, J. (2012). Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 3.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J. (2014). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E203-E212.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., et al. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308, 1786-1789.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., et al. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 359-364.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Kreil, D.P., Breinig, F., Lind, M., Schmitt, M.J., Simon, S.A., and Gurazada, S.G.R. (2010). RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO reports* 11, 65-71.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7, 193-195.
- Kastenmayer, J., and Green, P. (2000). Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13985-13990.
- Kawaguchi, R., and Bailey-Serres, J. (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5, 460-465.
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A., and Bailey-Serres, J. (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38, 823-839.

- Kerényi, Z., Mérai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., Barta, E., Nagy, F., and Silhavy, D. (2008). Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* 27, 1585-1595.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* 14, R36.
- Kim, E.-D., and Sung, S. (2012). Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. *Trends in plant science* 17, 16-21.
- Kim, J., and Rees, D.C. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33, 389-397.
- Kondrashov, A.V., Kieffmann, M., Ebnet, K., Khanam, T., Muddashetty, R.S., and Brosius, J. (2005). Inhibitory effect of naked neural BC1 RNA or BC200 RNA on eukaryotic in vitro translation systems is reversed by poly (A)-binding protein (PABP). *Journal of molecular biology* 353, 88-103.
- Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z.-Q., Liu, X.-Q., Zhao, S.-Q., Wei, L., and Gao, G. (2007). CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic acids research* 35, W345-W349.
- Kung, J.T., and Lee, J.T. (2013). RNA in the loop. *Developmental cell* 24, 565-567.
- Łabno, A., Tomecki, R., and Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways-Enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1863, 3125-3147.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science* 18, 157-166.
- Lange, H., and Gagliardi, D. (2010). The Exosome and 3'-5' RNA Degradation in Plants. In *RNA Exosome*. Springer, pp 50-62.
- Lapidot, M., and Pilpel, Y. (2006). Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO reports* 7, 1216-1222.
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.-F., Mun, J.-H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., et al. (2013). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *Journal of Experimental Botany*.
- Larrainzar, E., Riely, B.K., Kim, S.C., Carrasquilla-Garcia, N., Yu, H.-J., Hwang, H.-J., Oh, M., Kim, G.B., Surendrarao, A.K., and Chasman, D. (2015). Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant physiology* 169, 233-265.
- Lauria, M., and Rossi, V. (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* 1809, 369-378.
- Lawrence, M., Huber, W., Pages, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M.T., and Carey, V.J. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS computational biology* 9.

- Le Signor, C., Savoio, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., and Clarke, J. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnology Journal* 7, 430-441.
- Lee, Y., and Rio, D.C. (2015). Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annual review of biochemistry* 84, 291-323.
- Lelli, K.M., Slattery, M., and Mann, R.S. (2012). Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annual review of genetics* 46, 43-68.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.-P., Ané, J.-M., Lauber, E., Bisseling, T., et al. (2004). A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* 303, 1361-1364.
- Li, D., Kinkema, M., and Gresshoff, P.M. (2009). Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of plant physiology* 166, 955-967.
- Li, J., Liu, Z.J., Pan, Y.C., Liu, Q., Fu, X., Cooper, N.G., Li, Y., Qiu, M., and Shi, T. (2007). Regulatory module network of basic/helix-loop-helix transcription factors in mouse brain. *Genome Biol* 8, R244.
- Li, S., Le, B., Ma, X., Li, S., You, C., Yu, Y., Zhang, B., Liu, L., Gao, L., and Shi, T. (2016). Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. *Elife* 5, e22750.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., and Mo, B. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153, 562-574.
- Limpens, E., Moling, S., Hooiveld, G., Pereira, P.A., Bisseling, T., Becker, J.D., and Küster, H. (2013). Cell-and tissue-specific transcriptome analyses of *Medicago truncatula* root nodules. *PloS one* 8.
- Liu, J., Jung, C., Xu, J., Wang, H., Deng, S., Bernad, L., Arenas-Huertero, C., and Chua, N.-H. (2012). Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24, 4333-4345.
- Liu, M.J., Wu, S.H., and Chen, H.M. (2012). Widespread translational control contributes to the regulation of *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Mol Syst Biol* 8, 566.
- Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Penuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K.A., and VandenBosch, K.A. (2006). Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 140, 221-234.
- Lorković, Z.J. (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends in plant science* 14, 229-236.
- Marquez, Y., Brown, J.W., Simpson, C., Barta, A., and Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome research* 22, 1184-1195.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential

for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 144, 324-335.

Mathews, A., Carroll, B., and Gresshoff, P. (1990). The genetic interaction between non-nodulation and supernodulation in soybean: an example of developmental epistasis. *Theoretical and applied genetics* 79, 125-130.

Matzke, M.A., Kanno, T., and Matzke, A.J. (2015). RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annual review of plant biology* 66, 243-267.

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., et al. (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* 5, e9519.

Meade, H.M., and Signer, E. R. (1977). Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. . *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2076-2078.

Merchante, C., Stepanova, A.N., and Alonso, J.M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant Journal* 90, 628-653.

Merret, R., Carpentier, M.-C., Favory, J.-J., Picart, C., Descombin, J., Bousquet-Antonelli, C., Tillard, P., Lejay, L., Deragon, J.-M., and Charng, Y.-y. (2017). Heat shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock. *Plant physiology* 174, 1216-1225.

Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Loughon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R., et al. (2007). A Novel Nuclear Protein Interacts With the Symbiotic DMI3 Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 912-921.

Meteignier, L.-V., El Oirdi, M., Cohen, M., Barff, T., Matteau, D., Lucier, J.-F., Rodrigue, S., Jacques, P.-E., Yoshioka, K., and Moffett, P. (2017). Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 68, 2333-2344.

Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., et al. (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19, 1221-1234.

Missra, A., Ernest, B., Lohoff, T., Jia, Q., Satterlee, J., Ke, K., and von Arnim, A.G. (2015). The circadian clock modulates global daily cycles of mRNA ribosome loading. *The Plant Cell* 27, 2582-2599.

Mitra, R.M., and Long, S.R. (2004). Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol* 134, 595-604.

- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F., and Gamas, P. (2011). Transcription Reprogramming during Root Nodule Development in *Medicago truncatula*. *PLoS One* 6, e16463.
- Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A., and Mallory, A.C. (2013). Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic acids research* 41, 4699-4708.
- Muhrad, D., and Parker, R. (1999). Recognition of yeast mRNAs as “nonsense containing” leads to both inhibition of mRNA translation and mRNA degradation: implications for the control of mRNA decapping. *Molecular biology of the cell* 10, 3971-3978.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., and Imberty, A. (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* 16, 801-809.
- Murphy, E., Smith, S., and De Smet, I. (2012). Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance. *The Plant Cell* 24, 3198-3217.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J. (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18843-18848.
- Nagymihály, M., Veluchamy, A., Györgypál, Z., Ariel, F., Jégu, T., Benhamed, M., Szűcs, A., Kereszt, A., Mergaert, P., and Kondorosi, É. (2017). Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 4543-4548.
- Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., and Kavalali, E.T. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science* 351, 271-275.
- Nicolai, M., Roncato, M., Canoy, A., Rouquie, D., Sarda, X., Freyssinet, G., and Robaglia, C. (2006). Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in Arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiology* 141, 663-673.
- Noh, B., Lee, S.-H., Kim, H.-J., Yi, G., Shin, E.-A., Lee, M., Jung, K.-J., Doyle, M.R., Amasino, R.M., and Noh, Y.-S. (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *The Plant Cell* 16, 2601-2613.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11, 252-263.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59, 519-546.

- Oldroyd, G.E., Harrison, M.J., and Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol* 137, 1205-1210.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45, 119-144.
- Onouchi, H., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Kawasaki, D., Nagami-Yamashita, Y., Murota, K., Kezuka-Hosomi, A., Chiba, Y., and Naito, S. (2008). Nascent Peptide-Mediated Translation Elongation Arrest of *Arabidopsis thaliana* CGS1 mRNA Occurs Autonomously. *Plant and Cell Physiology* 49, 549-556.
- Orban, T.I., and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna* 11, 459-469.
- Ovchinnikova, E., Journet, E.-P., Chabaud, M., Cosson, V., Ratet, P., Duc, G., Fedorova, E., Liu, W., den Camp, R.O., and Zhukov, V. (2011). IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp. *Molecular plant-microbe interactions* 24, 1333-1344.
- Pal, S.K., Liput, M., Piques, M., Ishihara, H., Obata, T., Martins, M.C., Sulpice, R., van Dongen, J.T., Fernie, A.R., and Yadav, U.P. (2013). Diurnal changes of polysome loading track sucrose content in the rosette of wild-type *Arabidopsis* and the starchless *pgm* mutant. *Plant physiology* 162, 1246-1265.
- Parker, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671-702.
- Pecrix, Y., Staton, S.E., Sallet, E., Lelandais-Brière, C., Moreau, S., Carrère, S., Blein, T., Jardinaud, M.-F., Latrasse, D., and Zouine, M. (2018). Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nature plants* 4, 1017-1025.
- Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A.B., Venkateshwaran, M., Riely, B.K., Otegui, M.S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M.G., Cook, D.R., et al. (2007). The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol* 145, 192-203.
- Penmetsa, R.V., and Cook, D.R. (2000). Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 123, 1387-1398.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 180-201.
- Pestova, T.V., and Kolupaeva, V.G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & development* 16, 2906-2922.
- Pislariu, C.I., Murray, J., Wen, J., Cosson, V., Duvvuru Muni, R.R., Wang, M., Benedito, V., Andrianakaja, A., Cheng, X., Torres Jerez, I., et al. (2012). A *Medicago truncatula* tobacco-retrotransposon (Tnt1)-insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiology*.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., and Frugier, F. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 65, 622-633.

- Pozner, A., Goldenberg, D., Negreanu, V., Le, S.-Y., Elroy-Stein, O., Levanon, D., and Groner, Y. (2000). Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap-and internal ribosome entry site-dependent mechanisms. *Molecular and cellular biology* 20, 2297-2307.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., and Graveley, B.R. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111-1124.
- Pulak, R., and Anderson, P. (1993). mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes & development* 7, 1885-1897.
- Qian, S., Wang, Y., Ma, H., and Zhang, L. (2015). Expansion and functional divergence of Jumonji C-containing histone demethylases: significance of duplications in ancestral angiosperms and vertebrates. *Plant physiology* 168, 1321-1337.
- Quandt, H.J., Pühler, A., and Broer, I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 699-706.
- Ransohoff, J.D., Wei, Y., and Khavari, P.A. (2018). The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nature reviews Molecular cell biology* 19, 143.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., and Blankenship, R.E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution* 21, 541-554.
- Reddy, A.S., Marquez, Y., Kalyna, M., and Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *The Plant Cell* 25, 3657-3683.
- Reid, D.E., Ferguson, B.J., Hayashi, S., Lin, Y.-H., and Gresshoff, P.M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annals of botany* 108, 789-795.
- Relic, B., Perret, X., Estrada-Garcia, M.T., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G., and Broughton, W.J. (1994). Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol Microbiol* 13, 171-178.
- Ren, H., and Gray, W.M. (2015). SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Molecular plant* 8, 1153-1164.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., Bailey-Serres, J., Crespi, M., and Zanetti, M.E. (2013). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 73, 289-301.
- Ribeiro, D.M., Araújo, W.L., Fernie, A.R., Schippers, J.H.M., and Mueller-Roeber, B. (2012). Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63, 2769-2786.
- Ridley, S.P., Sommer, S.S., and Wickner, R.B. (1984). Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by LA-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and LA-HN. *Molecular and Cellular Biology* 4, 761-770.

- Ried, M.K., Antolín-Llovera, M., and Parniske, M. (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *Elife* 3, e03891.
- Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual review of biochemistry* 81, 145-166.
- Rival, P., de Billy, F., Bono, J.-J., Gough, C., Rosenberg, C., and Bensmihen, S. (2012). Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. *Development* 139, 3383-3391.
- Robertson, G.P., and Vitousek, P.M. (2009). Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environment and Resources* 34, 97-125.
- Roth, L.E., and Jeon, K. (1988). Homology in endosymbiotic systems: the term symbiosome. In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, A.P. St. Paul, ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Roth, L.E., and Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* 49, 13-23.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., and Moreau, S. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* 77, 817-837.
- Roy, B., and Jacobson, A. (2013). The intimate relationships of mRNA decay and translation. *Trends in Genetics* 29, 691-699.
- Roy, B., and von Arnim, A.G. (2013). Translational regulation of cytoplasmic mRNAs. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 11.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., and Duc, G. (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ -ray mutagenesis. *Plant Science* 111, 63-71.
- Saha, S., Dutta, A., Bhattacharya, A., and DasGupta, M. (2014). Intracellular catalytic domain of symbiosis receptor kinase hyperactivates spontaneous nodulation in absence of rhizobia. *Plant physiology* 166, 1699-1708.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., et al. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19, 610-624.
- Satge, C., Moreau, S., Sallet, E., Lefort, G., Auriac, M.-C., Rembliere, C., Cottret, L., Gallardo, K., Noiro, C., and Jardinaud, M.-F. (2016). Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. *Nature plants* 2, 1-10.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191-195.

- Schmid, M., and Jensen, T.H. (2008). The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends in biochemical sciences* 33, 501-510.
- Schmidt, C., Kowalinski, E., Shanmuganathan, V., Defenouillère, Q., Braunger, K., Heuer, A., Pech, M., Namane, A., Berninghausen, O., and Fromont-Racine, M. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome–Ski2–Ski3–Ski8 helicase complex. *Science* 354, 1431-1433.
- Schwartz, D.C., and Parker, R. (2000). Interaction of mRNA translation and mRNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES* 39, 807-826.
- Shatkin, A.J., and Manley, J.L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nature structural biology* 7, 838-842.
- Shi, Y., and Whetstine, J.R. (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Molecular cell* 25, 1-14.
- Shin, H., Lee, J., Kim, Y., Jang, S., Lee, Y., Kim, S., and Lee, Y. (2017). Knockdown of BC200 RNA expression reduces cell migration and invasion by destabilizing mRNA for calcium-binding protein S100A11. *RNA biology* 14, 1418-1430.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nature structural & molecular biology* 19, 594.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T. (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* 145, 183-191.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308, 1789-1791.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Sorenson, R., and Bailey-Serres, J. (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 2373-2378.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M. (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics* 9, e1003352.
- Stirnemann, C.U., Petsalaki, E., Russell, R.B., and Müller, C.W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in biochemical sciences* 35, 565-574.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28, 1102-1104.
- Szcześniak, M.W., Rosikiewicz, W., and Makałowska, I. (2016). CANTATAdb: a collection of plant long non-coding RNAs. *Plant and Cell Physiology* 57, e8-e8.

- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., et al. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 54, 335-347.
- Takagi, N., and Ueguchi, C. (2012). Enhancement of meristem formation by bouquet-1, a mis-sense allele of the VERNALIZATION INDEPENDENCE 3 gene encoding a WD 40 repeat protein in *Arabidopsis thaliana*. *Genes to Cells* 17, 982-993.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research* 21, 1677.
- Tenenbaum, S.A., Carson, C.C., Lager, P.J., and Keene, J.D. (2000). Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 14085-14090.
- Tenenbaum, S.A., Lager, P.J., Carson, C.C., and Keene, J.D. (2002). Ribonomics: identifying mRNA subsets in mRNP complexes using antibodies to RNA-binding proteins and genomic arrays. *Methods* 26, 191-198.
- Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878.
- Timmers, A.C., Auriac, M.C., and Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126, 3617-3628.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., et al. (2006). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441, 1153-1156.
- Toh-E, A., Guerry, P., and Wickner, R.B. (1978). Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 136, 1002-1007.
- Townsley, B.T., Covington, M.F., Ichihashi, Y., Zumstein, K., and Sinha, N.R. (2015). BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Frontiers in plant science* 6, 366.
- Tran, N.T., Su, H., Khodadadi-Jamayran, A., Lin, S., Zhang, L., Zhou, D., Pawlik, K.M., Townes, T.M., Chen, Y., and Mulloy, J.C. (2016). The AS-RBM15 lncRNA enhances RBM15 protein translation during megakaryocyte differentiation. *EMBO reports* 17, 887-900.
- Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature biotechnology* 31, 46.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7, 562-578.

- Traubenik, S., Reynoso, M.A., Hobecker, K., Lancia, M., Hummel, M., Rosen, B., Town, C., Bailey-Serres, J., Blanco, F., and Zanetti, M.E. (2020). Reprogramming of Root Cells during Nitrogen-Fixing Symbiosis Involves Dynamic Polysome Association of Coding and Noncoding RNAs. *The Plant Cell* 32, 352-373.
- Trieu, A.T., and Harrison, M.J. (1996). Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 16, 6-11.
- Tsukada, Y.-i., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Tzamarias, D., Roussou, I., and Thireos, G. (1989). Coupling of GCN4 mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation. *Cell* 57, 947-954.
- van Bel, A.J., and Hafke, J.B. (2005). Physiochemical determinants of phloem transport. In *Vascular transport in plants*. (Elsevier), pp 19-44.
- van Hoof, A., and Parker, R. (1999). The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* 99, 347-350.
- Van Hoof, A., and Wagner, E.J. (2011). A brief survey of mRNA surveillance. *Trends in biochemical sciences* 36, 585-592.
- van Mourik, H., van Dijk, A.D., Stortenbeker, N., Angenent, G.C., and Bemer, M. (2017). Divergent regulation of Arabidopsis SAUR genes: a focus on the SAUR10-clade. *BMC plant biology* 17, 245.
- Vaughn, M.W., and Martienssen, R.A. (2005). Finding the right template: RNA Pol IV, a plant-specific RNA polymerase. *Molecular cell* 17, 754-756.
- Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M.L., de Carvalho-Niebel, F., and Oldroyd, G.E. (2015). The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root. *The Plant Cell* 27, 3410-3424.
- Vernié, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.-P., Rogers, C., Oldroyd, G., Frugier, F., Niebel, A., and Gamas, P. (2008). EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 20, 2696-2713.
- Wais, R.J. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13407-13412.
- Wan, X., Hontelez, J., Lillo, A., Guarnerio, C., van de Peut, D., Fedorova, E., Bisseling, T., and Franssen, H. (2007). *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development. *Journal of experimental botany* 58, 2033-2041.
- Wang, C., Reid, J.B., and Foo, E. (2018). The Art of Self-Control Autoregulation of Plant-Microbe Symbioses. *Frontiers in plant science* 9, 988.

- Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I.A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I.B., and Tiedge, H. (2002). Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. *Journal of Neuroscience* 22, 10232-10241.
- Wang, J.Y., Xiao, L., and Wang, J.Y. (2017). Posttranscriptional regulation of intestinal epithelial integrity by noncoding RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8, e1399.
- Wang, L., Park, H.J., Dasari, S., Wang, S., Kocher, J.-P., and Li, W. (2013). CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic acids research* 41, e74-e74.
- Wang, Y., Wang, L., Zou, Y., Chen, L., Cai, Z., Zhang, S., Zhao, F., Tian, Y., Jiang, Q., Ferguson, B.J., et al. (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell* 26, 4782-4801.
- Willmann, M.R., Berkowitz, N.D., and Gregory, B.D. (2014). Improved genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts in eukaryotes GMUCT 2.0. *Methods* 67, 64-73.
- Wilson, R.C., and Doudna, J.A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics* 42, 217-239.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* 141, 3517-3528.
- Xu, G., Greene, G.H., Yoo, H., Liu, L., Marqués, J., Motley, J., and Dong, X. (2017). Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature* 545, 487-490.
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell* 18, 3386-3398.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., et al. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 20540-20545.
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Martindale, J.L., De, S., Huarte, M., Zhan, M., Becker, K.G., and Gorospe, M. (2012). LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular cell* 47, 648-655.
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A., Mayer, K.F.X., Gouzy, J., Schoof, H., et al. (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480, 520-524.
- Yu, A., Saudemont, B., Bouteiller, N., Elvira-Matlot, E., Lepère, G., Parent, J.-S., Morel, J.-B., Cao, J., Elmayan, T., and Vaucheret, H. (2015). Second-site mutagenesis of a hypomorphic *argonaut1* allele identifies SUPERKILLER3 as an endogenous suppressor of transgene posttranscriptional gene silencing. *Plant physiology* 169, 1266-1274.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M. (2010). A C Subunit of the Plant Nuclear Factor NF-Y Required for Rhizobial Infection and Nodule

Development Affects Partner Selection in the Common Bean-Rhizobium etli Symbiosis. *The Plant Cell* 22, 4142-4157.

Zanetti, M.E., Chang, I.F., Gong, F., Galbraith, D.W., and Bailey-Serres, J. (2005). Immunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* 138, 624-635.

Zhang, L., Ding, L., Cheung, T.H., Dong, M.Q., Chen, J., Sewell, A.K., Liu, X., Yates, J.R., 3rd, and Han, M. (2007). Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2. *Mol Cell* 28, 598-613.

Zhang, L., Liu, X., Gaikwad, K., Kou, X., Wang, F., Tian, X., Xin, M., Ni, Z., Sun, Q., Peng, H., et al. (2017). Mutations in eIF5B Confer Thermosensitive and Pleiotropic Phenotypes via Translation Defects in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 29, 1952-1969.

Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., and Wen, X. (2015). Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* 348, 120-123.

Zhao, L., and Kunst, L. (2016). SUPERKILLER complex components are required for the RNA exosome-mediated control of cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant physiology* 171, 960-973.

Zhu, L.J., Gazin, C., Lawson, N.D., Pagès, H., Lin, S.M., Lapointe, D.S., and Green, M.R. (2010). ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC bioinformatics* 11, 237.

Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes & development* 31, 88-100.