

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE CIENCIA BIOLOGICAS

Trabajo de tesis doctoral: "Caracterización funcional de factores de transcripción asociados a la respuesta a auxinas en raíces de *M. truncatula*"

Tesista: Lic. Kirolinko Cristina Alejandra

Director/a: Dra. María Eugenia Zanetti

Año: 2023



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE CIENCIA BIOLOGICAS

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

"Caracterización funcional de factores de transcripción asociados a la respuesta a auxinas en raíces de *M. truncatula*"

Lic. Kirolinko Cristina Alejandra

Director/a: Dra. María Eugenia Zanetti

Año: 2023

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 de la Dra. María Eugenia Zanetti Los resultados obtenidos durante el presente trabajo de tesis han dado origen a la siguiente publicación:

<u>Kirolinko, C.</u>, Hobecker, K., Wen, J., Mysore, K. S., Niebel, A., Blanco, F. A., & Zanetti, M. E. (2021). Auxin Response Factor 2 (ARF2), ARF3, and ARF4 Mediate Both Lateral Root and Nitrogen Fixing Nodule Development in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*. Retrieved from https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.659061

#### Agradecimientos

A la Dra. María Eugenia Zanetti y al Dr. Flavio Blanco por la dirección de este trabajo. Por abrirme las puertas del grupo y permitirme ser parte todos estos años. Por su dedicación para formarme como profesional y principalmente por su confianza, por sus charlas académicas y de todos los días.

A mis compañeros de LBR, los actuales y los ex R4 por todos los momentos compartidos, las charlas durante y después del laboratorio con mate o cerveza de por medio. Todos estos años en el laboratorio no habrían sido lo mismo sin cada uno de ustedes. Por la disposición para compartir conocimientos, colaborar con los experimentos, sea sacar un cultivo un domingo, o ayudarme a procesar miles de plantas para un ChIP. Por todos los desafíos superados, las contaminaciones, la pandemia, los cultivos fallidos, plantas sin nódulos y algunas mudanzas. A Sole, Mili y Car por ser sostén indispensable, gracias.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme formado profesionalmente, que sea siempre libre, pública y gratuita.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular por posibilitar la realización de este trabajo.

A los CPAs del Instituto, especialmente a Silvana por sus aportes en el trabajo diario dentro del laboratorio.

A CONICET por haberme otorgado la beca que hizo posible la realización de este trabajo.

A Santi y Tarás por llegar a completar mi vida.

A mis padres Alejandro y Dora por su apoyo incondicional, por acompañarme siempre en cada etapa.

A mi hermana Kari por su apoyo, compañía y amistad. Por escucharme siempre, por estar ahí en todo momento, desde los primeros días de jardín al primer día de la facultad.

A todos los investigadores y becarios del IBBM por la generosidad y buena predisposición para colaborar.

A mis amigos de Berisso, La Plata, y otros puntos del país que son muchos para nombrar, pero su amistad y apoyo fueron fundamentales durante esta etapa de mi vida.

### Índice

Resumen	1
Introducción	4
1. Sistema radical en plantas	5
2. Desarrollo de las raíces laterales	7
3. Importancia del nitrógeno en la agricultura	8
4. Importancia de las leguminosas	9
5. <i>M. truncatula</i> como sistema modelo de estudio de leguminosas	11
6. Mecanismo de infección rizobiana y organogénesis del nódulo durante la simbiosis fijadora de nitrógeno	12
7. Vías de señalización activadas por los rizobios en las raíces de las leguminosas	15
8. Función de las hormonas vegetales en la arquitectura de la raíz y la formación de nó fijadores de nitrógeno	ódulos 17
9. Similitudes y diferencias entre órganos laterales en las raíces de leguminosas	20
10. Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs)	21
11. La vía de miR390, tasiARFs, <i>ARFs</i> y su relación con el desarrollo de órganos laterale raíz	es de la 23
12. Genes LBD (Lateral Organ Boundaries-Domain)	26
Hipótesis y objetivos	29
Hipótesis y objetivo general	30
Objetivos específicos	31
Capítulo 1	32
Resultados	33
Análisis filogenético de la familia de factores de transcripción ARF de A. thaliana y M. truncatula	33
Análisis de los niveles de transcriptos de <i>MtARF2, MtARF3, MtARF4a</i> y <i>MtARF4b</i> durar desarrollo de raíces laterales y formación de nódulos en <i>M. truncatula</i>	nte el 36
El aumento en los niveles de los transcriptos MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b e etapas tempranas de la interacción simbiótica es dependiente de Factor Nod	en 37
Silenciamiento simultáneo de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b en raíces de M. truncatu	ıla 39
El silenciamiento de los factores de transcripción <i>MtARF2, MtARF3</i> y <i>MtARF4a/b</i> afe formación de nódulos e hilos de infección en <i>M. truncatula</i>	ecta la 42
El silenciamiento de los transcriptos <i>MtARF2, MtARF3</i> y <i>MtARF4a/b</i> altera la expres los genes de nodulación en respuesta a <i>S. meliloti</i>	ión de 46
Obtención y caracterización de una mutante con inserción del transposón <i>Tnt-1</i> en el <i>MtARF4a</i> ( <i>arf4a</i> )	gen 47

El gen MtARF4a es requerido para la nodulación y la infección por rizobio
El silenciamiento de los transcriptos <i>MtARF2, MtARF3</i> y <i>MtARF4a/b</i> regula negativamente la longitud de las raíces principales y laterales
MtARF4a es requerido para el desarrollo de la raíz de M. truncatula
Discusión
MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b controlan la organogénesis de los nódulos y la arquitectura de la raíz
Los ARFs y su función en la infección por rizobios60
ARF y la vía de señalización del factor Nod61
Capítulo 2
Resultados
Búsqueda de blancos de acción putativos de la vía miR390/TAS364
Identificación de <i>targets</i> de la vía del miR390/ <i>TAS3</i> 68
Construcción de alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos de la familia LBD 72
Análisis de las regiones abiertas de la cromatina y de sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen <i>MtLBD17/29a</i> en raíces de <i>M. truncatula</i>
Ensayo de Chip PCR para evaluar la unión de MtARF2 al promotor de MtLBD17/29a
Caracterización de la expresión de <i>MtLBD17/29a</i> en <i>M. truncatula</i> en diferentes tejidos, estadios de desarrollo de raíces laterales y durante la simbiosis fijadora de nitrógeno 80
Análisis de la expresión de <i>MtLBD17/29a</i> en respuesta al Factor Nod y su dependencia con la vía de señalización del Factor Nod
Análisis de la expresión espacial y temporal del gen <i>MtLBD17/29a</i> en raíces de <i>M. truncatula</i> 
Discusión
Capítulo 3
Resultados
Análisis funcional del gen MtLBD17/29a mediante silenciamiento postranscripcional91
El silenciamiento de MtLBD17/29a reduce la formación de nódulos en M. truncatula93
<i>MtLBD17/29a</i> es requerido para la infección por rizobio
El silenciamiento de <i>MtLBD17/29a</i> interfiere con la activación de los genes de nodulación tempranos <i>MtNSP1, MtNSP2 y MtNF-YA1</i> durante la simbiosis
El silenciamiento de MtLBD17/29a afecta la arquitectura de la raíz
Análisis funcional del gen MtLBD17/29a por sobreexpresión
La sobreexpresión de MtLBD17/29a afecta la nodulación y la infección por rizobio 105
La sobreexpresión de <i>MtLBD17/29a</i> interfiere con la regulación de genes marcadores de la nodulación
Análisis de la arquitectura de raíz en plantas OXLBD17/29a
Discusión

	MtLBD17/29a controla la arquitectura de las raíces de M. truncatula	111
	MtLBD17/29a controla la organogénesis de nódulos de M. truncatula	112
	MtLBD17/29a y su relación con marcadores de nodulación temprana	114
Со	nclusiones	117
Ma	ateriales y métodos	120
	1. Material biológico	121
	2. Vectores de clonado	121
	3. Medios de cultivo	122
	4. Clonado y transformación de DNA plasmídico	124
	4.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	124
	4.2 Electroforesis en geles de agarosa	124
	4.3 Clonado en pENTR/D-TOPO	125
	4.4 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)	125
	4.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	125
	4.6 Digestión de DNA con enzimas de restricción	126
	4.7 Transformación de células de <i>E. coli</i> TOP10 electro-competentes	126
	4.8 Transformación de células de A. rhizogenes mediante electroporación	126
	4.9 Minipreparación de DNA plasmídico	126
	5. Crecimiento de <i>M. truncatula</i> y generación de plantas compuestas	127
	5.1 Esterilización superficial y germinación de semillas de <i>M.truncatula</i>	127
	5.2 Método de transformación de raíces de <i>M. truncatula</i>	127
	6. Ensayos de nodulación	128
	6.1 Inoculación de las plantas con <i>S. meliloti</i>	128
	6.2 Cuantificación del número de nódulos	129
	6.3 Observación y cuantificación de hilos de infección	129
	6.4 Determinación del peso seco de la parte aérea y de raíz	129
	6.5 Determinación del número de hojas o la longitud de la parte aérea	130
	6.6 Recolección de tejidos	130
	6.7 Análisis de la arquitectura de raíz	130
	6.8 Sensibilidad de las raíces compuestas a auxinas	130
	7. Métodos de extracción de ácidos nucleicos	131
	7.1 Extracción de RNA	131
	7.2 Cuantificación del RNA y digestión con DNAsa libre de RNAsa	131
	7.3 Síntesis de cDNA	132
	7.4 PCR cuantitativa (qPCR)	132

8. ChIP-PCR	133
8.1 Fijación y colección de tejido	133
8.2 Aislamiento de núcleos y sonicación	133
8.3 Preparación de Dynabeads conjugadas a anti-FLAG o IgGs	134
8.4 Inmunoprecipitación	135
8.5 Precipitación	135
8.6 Análisis de datos	136
9. Tinción y microscopía	136
9.1 Tinción histoquímica de GUS y microscopía de campo claro	136
9.2 Tinción con SYTO9 e loduro de propidio	136
9.3 Microscopia de fluorescencia	136
10. Análisis estadístico	137
11. Análisis bioinformáticos generales	137
11.1 Análisis general de secuencias y diseño de primers	137
11.2 Bases de datos de secuencias genómicas	137
11.3 Base de datos de secuencias de aminoácidos	137
11.4 Análisis filogenéticos	137
11.5 Análisis de sintenia	138
11.6 Base de datos de expresión utilizadas	138
11.7 Análisis de elementos regulatorios en promotores	138
11.8 Los análisis filogenéticos	138
11.9 Procesamiento y análisis de los datos de RNA-seq	138
11.10 Heatmap	141
ANEXOS	142
Anexo 1: Primers	142
Anexo 2: Abreviaturas	144
Anexo 3: Bibliografía	147

#### Resumen

Las plantas leguminosas tienen la capacidad de formar dos tipos de órganos postembrionarios en sus raíces; por un lado, las raíces laterales (RLs) que participan en la captura de agua y nutrientes, y por otro, los nódulos fijadores de nitrógeno que surgen como resultado de la asociación simbiótica con bacterias del suelo llamadas rizobios. Esta interacción simbiótica permite la asimilación de nitrógeno atmosférico al metabolismo de la planta. La formación de nódulos fijadores de nitrógeno depende de un intercambio de señales entre ambos simbiontes, en el cual una molécula de naturaleza lipo-quitooligosacárida secretada por los rizobios, denominada factor Nod, es responsable de la activación de dos programas morfogenéticos en la raíz de la planta: la organogénesis del nódulo y la infección microbiana. Ambos tipos de órganos influencian directamente el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que comprender los mecanismos del desarrollo de raíces laterales y nódulos es crucial para mejorar la productividad de los cultivos de plantas leguminosas en sistemas agrícolas.

Las auxinas son hormonas vegetales con funciones cruciales en el desarrollo y la vida de las plantas. Diversos trabajos han demostrado que las raíces laterales y los nódulos comparten programas de desarrollo superpuestos que convergen en la formación e interpretación de los niveles máximos de auxina (auxina máxima). La percepción e interpretación de esta auxina máxima involucra una cascada de señalización que culmina en la activación de factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARFs por Auxin Response Factors). Los ARFs constituyen una gran familia de factores que median diferentes programas de desarrollo regulados por auxinas en las plantas. En particular, los ARF2, ARF3 y ARF4 son regulados postranscripcionalmente por una vía que involucra al microRNA390 (miR390) y al transcripto no codificante TAS3 (Trans-Acting siRNA 3). El clivaje de TAS3 guiado por el miR390 da lugar a la producción de pequeños RNAs de interferencia que actúan en trans (tasiRNAs por transacting interference small RNA) produciendo el clivaje de los transcriptos ARF2, ARF3 y ARF4. Anteriormente, en nuestro laboratorio se demostró que la activación constitutiva de la vía miR390/TAS3 promueve el alargamiento de las raíces laterales, pero afecta negativamente la organogénesis de los nódulos y la infección por rizobios durante la simbiosis fijadora de nitrógeno establecida entre la leguminosa Medicago truncatula y su par simbiótico Sinorhizobium meliloti. En este trabajo de tesis doctoral, observamos que la regulación de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b en respuesta a los rizobios depende de la percepción del factor Nod. A su vez, proporcionamos evidencia de que el silenciamiento simultáneo de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b o una mutación en el gen MtARF4a restringen la formación de nódulos y reducen el inicio y la progresión de los eventos de infección. Evidenciamos también que el silenciamiento de *MtARF2, MtARF3, MtARF4a* y *MtARF4b* altera los niveles del RNA mensajero (mRNA) que codifica el factor de transcripción de tipo GRAS NSP2 (*Nodulation Signaling 2*), el cual es un componente de la vía de señalización temprana de la nodulación. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina seguida de PCR (ChIP-PCR) indicaron que *MtNSP2* sería un *target* directo de MtARF2, sustentando la hipótesis que la vía miR390/*TAS3/ARFs* se interconecta directamente con la ruta de señalización del factor Nod. Además, las raíces con niveles reducidos de *MtARF2, MtARF3, MtARF4a* y *MtARF4b*, así como las plantas mutantes *arf4a*, exhiben una arquitectura de raíz alterada, evidenciada en una reducción en la longitud de las raíces (principal y lateral) y un aumento en la densidad de las raíces laterales.

A partir de un análisis transcriptómico se identificó que el gen MtLBD17/29a -un miembro de la familia LBD (Lateral Organ Boundaries Domain)- aumenta su expresión en respuesta al rizobio en raíces control, pero no en raíces que poseen activada la vía miR390/TAS3. Tampoco se verificó un aumento de los niveles del transcripto *MtLBD17/29a* en respuesta al rizobio en raíces silenciadas en MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b o en mutantes en MtARF4a. Más aun, ensayos de ChIP-PCR indicaron que MtARF2 se une directamente a una región promotora del gen MtLBD17/29a, sugiriendo que MtLBD17/29a sería un target directo de MtARF2. Los estudios de expresión espacio temporal mediante fusiones del promotor de MtLBD17/29a a genes reporteros revelaron que el promotor es activo en la zona meristemática de las raíces principales y laterales y en los primordios de las raíces laterales. Además, se observó actividad del promotor MtLBD17/29a en las células de la raíz subyacentes al sitio de infección del rizobio en etapas tempranas de la interacción simbiótica, y en las células del nódulo que rodean a las células infectadas en etapas más tardías de la simbiosis. Dicha expresión se solapa con la expresión de genes que son miembros de la vía miR390/TAS3 y del gen MtARF4a. De manera similar a lo descripto para MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b, la regulación de MtLBD17/29a en respuesta a los rizobios es dependiente de la percepción del factor Nod y requiere del regulador transcripcional maestro de la nodulación NIN (Nodule INception). Tanto el silenciamiento como la sobrexpresión de MtLBD17/29a afectaron la formación de nódulos y redujeron el número de los eventos de infección, sugiriendo que se requiere una fina regulación de los niveles de MtLBD17/29a para el establecimiento exitoso de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Observamos también que el silenciamiento de MtLBD17/29a altera los niveles de RNA mensajero del gen MtNSP2. Por otra parte, las plantas que sobreexpresan MtLBD17/29a o silenciadas en dicho gen exhibieron una arquitectura de raíz alterada: mientras que las plantas silenciadas mostraron una reducción en la longitud de las raíces

(principal y lateral) y un incremento en la densidad de las raíces laterales, las plantas que sobrexpresan *MtLBD17/29a* exhibieron un fenotipo opuesto, un aumento en la longitud de las raíces y una disminución en la densidad de las raíces laterales. En conjunto, nuestros resultados sugieren que estos miembros de la familia ARF y LBD son factores de transcripción que actúan de manera jerárquica modulando los programas morfogenéticos de desarrollo de las raíces y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

# Introducción

"¿Qué es la vida sin un poco de riesgo?"

Harry Potter de J. K. Rowling.

#### 1. Sistema radical en plantas

Las plantas son organismos sésiles, algunos de los cuales pueden vivir más de mil años. A diferencia de la mayoría de los animales, emplean un modo de desarrollo post-embrionario impulsado por la actividad continua de las células madre pluripotentes que forman el tejido meristemático, el cual dará lugar a nuevos tejidos y órganos. En consecuencia, las plantas pueden iniciar nuevos órganos luego de largos períodos de tiempo post-germinación y reemplazar fácilmente las estructuras corporales perdidas por la organogénesis *de novo* (Heidstra et al., 2014).

Los meristemas apicales están formados por células completamente indiferenciadas (indeterminadas) de la planta. Existen dos tipos de tejido de meristemas apicales: el meristema apical aéreo (SAM por sus siglas en inglés de *shoot apical meristem*), que da origen a órganos como las hojas y las flores, y el meristema apical de raíz (RAM por sus siglas en inglés de *root apical meristem*), que proporciona las células meristemáticas para el crecimiento futuro de las raíces. Las células del SAM y RAM se dividen rápidamente y se consideran indeterminadas, ya que no poseen ningún estado final definido (Scofield et al., 2006).

Las raíces son cruciales para la vida de la planta en una amplia variedad de procesos, como absorción de nutrientes y agua, el anclaje y el soporte mecánico, las funciones de almacenamiento y como la principal interfaz entre la planta y diversos factores bióticos y abióticos en el entorno del suelo (De Smet et al., 2010). Los sistemas de raíz están compuestos de raíces principales (RPs), que anclan el sistema radical al suelo creciendo hacia abajo, y las raíces laterales (RLs), que contribuyen a la captura de agua y nutrientes expandiendo la superficie radical. En la raíz principal se encuentran diferentes capas tisulares. La vasculatura es la capa más interna y está compuesta por los tejidos que conducen agua y nutrientes entre los diferentes tejidos de la planta denominados floema y xilema. Por fuera de la vasculatura se encuentra el periciclo, tejido en el cual se dan las primeras divisiones celulares que darán lugar a la formación de las raíces laterales. Seguido del periciclo se encuentra la endodermis, que es la capa celular encargada de regular la entrada de agua y minerales, formando una barrera natural entre la parte interna de la raíz y el córtex. Luego de la endodermis se encuentra el córtex, que puede estar compuesto de una o más capas celulares; por ejemplo, en Arabidopsis thaliana solo presenta una capa celular (Malamy et al., 1997), mientras que en Medicago truncatula se pueden distinguir hasta cinco (Xiao et al., 2014). El tejido más externo de la raíz es la epidermis, que se encuentra en contacto directo con el medio y tiene como característica que sus células pueden crecer en forma polar diferenciándose en pelos radicales (Figura 1).

A lo largo del eje longitudinal, la raíz principal se puede dividir en diferentes zonas de desarrollo (Ishikawa et al., 1995). En la punta de la raíz se distingue un centro quiescente (QC) encargado de aportar nuevas células al nicho de células madre y mantenerlas de forma indiferenciada y con capacidad de producir nuevas células. Por encima del RAM, se observa una zona de elongación en la cual las células dejan de dividirse y se elongan. Entre el RAM y la zona de elongación se encuentra el meristema basal, el cual tiene una función crítica en la especificación de células fundadoras de las raíces laterales (De Smet et al., 2010). La zona de diferenciación se encuentra por encima de elongación y es en esta zona donde las células se diferencian y las células epidérmicas pueden formar los pelos radicales (Figura 1). En una microescala, la arquitectura del sistema de raíces incluye también pelos radicales que aumentan la superficie de contacto con el entorno (Gilroy et al., 2000; Tominaga et al., 2011).



Figura 1. Diagrama simplificado de las distintas zonas de la raíz. Adaptado de Taiz L y Zeiger E., 2006.

#### 2. Desarrollo de las raíces laterales

El primordio de raíz lateral (PRL) se origina de las células fundadoras en el periciclo, la capa más externa del cilindro vascular (Dubrovsky et al., 2000). Cada primordio de raíz lateral sufre una división celular coordinada y la expansión celular, dando lugar a la emergencia y activación de meristemas. Típicamente, estos órganos laterales se inician cerca de la punta de la raíz y emergen en la zona de diferenciación (Figura 1). Las raíces laterales se originan de la desdiferenciación de células de la capa del periciclo que reactivan su división en un proceso regulado por fitohormonas y factores ambientales, integrando las etapas del desarrollo con las condiciones del suelo. En el origen de las raíces laterales algunas células del meristema basal se diferencian para luego convertirse en las células fundadoras de raíz lateral. El desarrollo de la raíz lateral posee dos etapas con una fase inicial de cuatro estadios de morfogénesis inicial para formar el primordio de raíz lateral, seguida de una fase de formación de meristema. La transición de la forma del órgano 3D bilateral a la radial también coincide con la transición de la morfogénesis temprana a las fases tardías de formación del meristema. El gen que codifica el factor de transcripción de la familia GRAS, SCARECROW (SCR), se expresa específicamente en la capa externa del estadio II y regula la formación de células precursoras del QC a través de divisiones celulares periclinales mediadas por SCR. El establecimiento del QC ocurre simultáneamente y facilita la transición de la fase de desarrollo del primordio de la raíz lateral en la etapa V (Figura 2) (Goh et al., 2016).

Muchas hormonas y señales ambientales afectan la iniciación y desarrollo de las raíces laterales. Estudios previos han revelado que existe una zona de acumulación de auxina en la raíz principal en la cual las células del periciclo podrían adquirir con mayor probabilidad una identidad de célula fundadora de raíz lateral. Cuando los gradientes en la distribución o percepción de auxina a lo largo de la raíz se alteran, ya sea genética o farmacológicamente, el patrón acropétalo (de abajo hacia arriba) que regula la formación de raíces laterales ya no puede mantenerse. Los hallazgos recientes sugieren un modelo en el que los sucesivos módulos de respuesta de auxina son cruciales para el inicio de la raíz lateral y los factores adicionales proporcionan más etapas de control (De Smet et al., 2010; De Smet et al., 2006).



**Figura 2. Etapas de la formación de raíces laterales en** *A. thaliana*. Se esquematizan la fase temprana y de formación de meristema en la formación de la raíz lateral. El factor de transcripción de la familia GRAS, SCARECROW (SCR), se expresa específicamente en la capa externa del etapa II y regula la formación de células precursoras del centro quiescente (QC) a través de divisiones celulares periclinales (indicadas por una línea discontinua amarilla en la etapa III). Adaptado de Goh, 2016.

#### 3. Importancia del nitrógeno en la agricultura

La atmósfera terrestre se encuentra compuesta por un 78,08 % de nitrógeno en su forma molecular (N<sub>2</sub>). Este elemento es esencial en la nutrición de todos los seres vivos ya que es necesario para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas y otros componentes celulares. A pesar de que se encuentra disponible en un alto porcentaje en la atmósfera, la mayoría de los organismos no pueden asimilar el N<sub>2</sub>, ya que es un elemento muy estable debido a la alta energía de activación requerida para romper el triple enlace covalente que posee. Tan sólo un pequeño grupo de bacterias y arqueobacterias tienen la capacidad de reducir el nitrógeno molecular a formas que se puedan asimilar al metabolismo (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Howarth et al., 2002). Estos microorganismos poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa que cataliza la reducción del nitrógeno llevándolo a amoníaco mediante la siguiente reacción:

 $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16 \text{ ATP} + 16 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{ ADP} + 16 \text{ Pi}$ 

Este complejo enzimático es inhibido en presencia de oxígeno, por lo que la reducción del N<sub>2</sub> mediante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) ocurre en ambientes anaerobios o microanaerobios (Zumft & Mortenson, 1975). Luego, las bacterias nitrificantes son capaces de convertir el amonio en nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Estas formas inorgánicas, en las que el nitrógeno puede ser asimilado por la mayoría de los seres vivos, se encuentran en muy baja proporción en los suelos y constituyen un factor limitante para el crecimiento vegetal, y como consecuencia para la productividad agrícola.

El desarrollo del proceso industrial Haber-Bosh, el cual permite la producción de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a partir de la reacción entre hidrógeno y nitrógeno molecular (N<sub>2</sub> + 3H<sub>2</sub> $\Leftrightarrow$  2NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  $\Delta$ H = -92.4 kJ·mol<sup>-1</sup>) facilitó el uso de fertilizantes, provocando un aumento importante en la producción del sector agrícola. Sin embargo, su utilización en forma masiva trajo consecuencias negativas tanto en la salud humana como en el medio ambiente. El uso de fertilizantes provoca que parte del amoníaco regado en las plantaciones sea transformado en nitritos y nitratos que contaminan las napas de agua subterránea. Estos compuestos ejercen efectos negativos en la salud humana ya que convierten la hemoglobina de la sangre en metahemoglobina, que reduce la concentración de oxígeno en la sangre. Además, el uso excesivo de fertilizantes libera a la atmósfera sustancias reactivas del nitrógeno como NO y N<sub>2</sub>O, las cuales disminuyen el ozono de la atmósfera, contribuyendo al efecto invernadero y aumentan la acidez de los suelos (Erisman et al., 2008). Estos efectos nocivos en el medio ambiente y en la salud humana plantean la necesidad de implementar estrategias alternativas de fertilización que contribuyan a la implementación de prácticas agrícolas sustentables.

#### 4. Importancia de las leguminosas

La asociación con microorganismos capaces de llevar a cabo la FBN ocurre en diez linajes de cuatro órdenes taxonómicos de plantas: Fabales, Fagales, Cucurbitales y Rosales, las cuales se conocen colectivamente como el clado de fijación de nitrógeno (NFC). Las fabáceas (*Fabaceae*) conocidas también como leguminosas (*Leguminosae*), con más de 20.000 especies, son la tercera familia más grande de plantas (Gepts et al., 2005). Dentro de esta familia se incluyen árboles, arbustos y plantas herbáceas perennes o anuales de extensa distribución mundial (Hofer et al., 2014). Varias especies leguminosas poseen una gran importancia económica y agronómica. Entre ellas se encuentran la soja (*Glycine max*), una de las leguminosas de mayor consumo utilizada tanto para la alimentación humana como animal, y el poroto (*Phaseolus vulgaris*), el cual constituye la fuente primaria de la dieta proteica en países en vías de desarrollo como México y Brasil. Por otro lado, la alfalfa (*Medicago sativa*) y diferentes especies de tréboles

(*Medicago hispida, Melilotus alba, Trifolium repens,* entre otras) y diversas especies del género Lotus son utilizadas como plantas forrajeras (Figura 3).



**Figura 3**. Plantas leguminosas de importancia agronómica utilizadas como A. forrajeras (*M. sativa*), B y C. para la alimentación humana y animal (*P. vulgaris y G. max,* respectivamente) y D. una especie utilizada como modelo de estudio de leguminosas (*M. truncatula*).

Las plantas leguminosas se pueden clasificar teniendo en cuenta su utilización agrícola en: leguminosas de grano, hortícolas, forrajeras o pascícolas. De todas ellas, las leguminosas de grano constituyen una fuente importante de nutrientes tanto en la dieta humana como animal, dado que poseen un alto contenido proteico y son fuente de vitaminas y minerales (ácido fólico, vitamina A y B, tiamina, riboflavinas, calcio, zinc, potasio, etc.). Por otra parte, las leguminosas son una alternativa para poder enfrentar problemas de desnutrición en diferentes países. Los cultivos de leguminosa representan un tercio de la producción de cultivos en el mundo y se presentan como una alternativa atractiva, de bajo costo y sustentable a la fertilización química en los sistemas agrícolas debido a que pueden asociarse simbióticamente a los rizobios, aumentando el contenido de nitrógeno en el suelo y beneficiando así el crecimiento de las siguientes plantaciones en programas de rotación cultivos. A su vez, mediante la descomposición e ingesta de la planta, los derivados del nitrógeno son incorporados al suelo y a la dieta de animales y humanos. Es por esta simbiosis que el crecimiento de las leguminosas se ve favorecido en condiciones en donde otros cultivos no podrían crecer, como ocurre en suelos con baja concentración de nitrógeno, potenciando la agricultura y disminuyendo el daño ambiental causado por la utilización de fertilizantes (Graham et al., 2003). La interacción simbiótica entre las leguminosas y rizobios representa una porción significativa de la FBN en todo el mundo. Cerca de 21 toneladas de nitrógeno son fijadas anualmente a partir de esta interacción, de las cuales entre 5 y 7 toneladas son incorporadas a los suelos, reduciendo en 8 a 12 mil millones de dólares el costo de la fertilización (Charpentier et al., 2010; Foyer et al., 2016). A su vez, la FBN permite reducir significativamente las poblaciones de patógenos vegetales, lo que se traduce en una menor aplicación de pesticidas en aquellos suelos donde la explotación agrícola es extensiva.

#### 5. M. truncatula como sistema modelo de estudio de leguminosas

Para estudiar la FBN entre leguminosas y rizobios se han aplicado numerosas técnicas derivadas de la biología molecular y la biotecnología moderna, las cuales contribuyen a mejorar y aumentar el rendimiento de los cultivos y reducir el uso de fertilizantes. *M. truncatula* es una especie perteneciente a la familia *Fabaceae* que ha sido seleccionada como una planta modelo para el estudio de la biología de las leguminosas y la simbiosis entre plantas y microorganismos. Esta especie posee numerosas características relevantes tales como un genoma diploide pequeño (470-550 Mbp) que ya ha sido secuenciado y anotado (Young et al., 2011, Pécrix et al, 2018), es autofertilizable y posee un tamaño relativamente pequeño, lo que permite que se pueda cultivar un alto número de plantas en un espacio reducido y que sea fácil su manipulación en el laboratorio. Además, posee un ciclo de vida corto y una alta diversidad natural. Por otro lado, su simbionte *Sinorhizobium meliloti* ha sido estudiado en profundidad y su genoma ha sido secuenciado completamente (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1004). Cabe mencionar también que la asociación simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti* ha sido caracterizada a nivel fisiológico, morfológico y molecular (Oldroyd et al., 2013).

La selección de *M. truncatula* por la comunidad internacional que estudia la biología de leguminosas ha permitido que se desarrollen herramientas genéticas y moleculares como datos de expresión a gran escala de distintos órganos, estadios de desarrollo y condiciones ambientales mediante la utilización de plataformas de microarreglos de DNA (Benedito et al., 2008) y secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) largos y pequeños. A estos datos de transcriptomas se suman también datos de estado de metilación del DNA, metilación de histonas y datos de accesibilidad de la cromatina a escala genómica (Pecrix et al., 2018; Reynoso et al., 2019; Satgé et al., 2016). A su vez, se han generado bancos de mutantes por inserciones con el transposón *Tnt-1* que permitieron la aplicación de estrategias de genética reversa al estudio de distintos procesos de desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales e interacciones con

microorganismos (D'Erfurth et al., 2003; Pislariu et al., 2012; Tadege et al., 2008). También se han desarrollado métodos de transformación estable mediados por *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud et al., 2003) y métodos de generación de plantas compuestas, las cuales presentan raíces transgénicas y parte aérea salvaje, mediante la transformación mediadas por bacterias de la especie *Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001). Estas bacterias dan lugar al desarrollo de raíces altamente ramificadas designadas en inglés como *hairy roots*.

## 6. Mecanismo de infección rizobiana y organogénesis del nódulo durante la simbiosis fijadora de nitrógeno

En condiciones de deficiencia de nitrógeno en el suelo, las raíces de las plantas leguminosas liberan moléculas fenólicas (flavonoides e isoflavonoides) que actúan como quimioatractantes bacterianos (Perret et al., 2000) y desencadenan en los rizobios la activación de un conjunto de genes cuyos productos participan en la síntesis y liberación de moléculas de naturaleza lipoquitooligosacarídica (LCOs) conocidas como factores Nod (NFs por sus siglas en inglés de *Nod factors*). Estos NFs poseen diversas sustituciones en la estructura del oligosacárido y los grupos acilo unidos (Perret et al., 2000), los cuales son determinantes de la compatibilidad de la interacción entre una planta leguminosa hospedadora y una especie de rizobio (Oldroyd et al., 2008).

Los NFs son reconocidos por las células de la planta, desencadenando una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares que llevan, finalmente, a la formación de un nódulo funcional. Este proceso incluye la activación de dos procesos morfogenéticos independientes, pero altamente coordinados: la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo. La infección rizobiana puede darse por mecanismos de crack-entry, intercelular e intracelular (Held et al., 2010; L. H. Madsen et al., 2010). El modo de infección mejor caracterizado es el intracelular, en el cual luego de la adhesión de la bacteria a los pelos radicales en crecimiento y la percepción de los NFs, los pelos radicales cambian su eje de crecimiento y se curvan alrededor de las bacterias formando una microcolonia. Dentro de estos rulos las bacterias proliferan dando lugar a la formación de los llamados focos o bolsillos de infección (Murray et al., 2011). En estos focos, la membrana celular del pelo radical se invagina dando lugar a la formación de los hilos de infección (ITs), estructuras tubulares huecas a través de la cual los rizobios se dividen. Los ITs se elongan y ramifican hasta infectar las células vegetales del nódulo en desarrollo (Oldroyd et al., 2011). Concomitantemente con la formación y elongación de los ITs, las células del córtex, periciclo y endodermis reactivan su división celular, dado lugar a la formación del primordio nodular (Kondorosi & Kondorosi, 2004). Los ITs crecen y alcanzan las células del primordio del nódulo, en las cuales los rizobios son internalizados en estructuras tipo organelas denominadas simbiosomas (Roth et al., 1989). Dentro de estos simbiosomas las bacterias diferencian a bacteroides, se expresan los genes que conforman el complejo nitrogenasa y comienza la FBN (Figura 4). Dado que la actividad de la nitrogenasa es inhibida por altas concentraciones de oxígeno, los nódulos maduros expresan el gen que codifica la leghemoglobina, la cual contribuye a mantener un ambiente microaerobio dentro del nódulo, confiriendo una coloración rosada a los nódulos.



**Figura 4. Esquema de la raíz de** *M. truncatula* **y de la infección rizobiana.** Los rizobios se adhieren al pelo radical provocando la formación de un bucle que rodea a la microcolonia, se invagina la membrana plasmática y se degrada la pared celular vegetal dando lugar a la formación del IT, que progresa hacia el interior de la raíz. El rizobio se divide dentro del IT. Al mismo tiempo, comienzan las primeras divisiones celulares del periciclo, endodermis y córtex de la raíz. 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 en estructuras intracelulares responsables de la FBN denominadas simbiosomas. Adaptado de Barton, 2007.

Los nódulos de las leguminosas pueden clasificarse en dos grandes tipos dependiendo de su origen y morfología: determinados e indeterminados. Los nódulos de tipo determinado, presentes en leguminosas de climas tropicales como *Lotus japonicus*, poroto y soja, se desarrollan a partir de las células del córtex externo y poseen una actividad meristemática transitoria que desaparece tempranamente. Estos nódulos crecen por expansión celular adoptando una forma globular. Por otro lado, los nódulos indeterminados, presentes en leguminosas de climas templados como *M. truncatula*, alfalfa y arveja, se forman por la activación de las divisiones celulares en el córtex externo e interno, el periciclo y la endodermis (Xiao et al., 2014). Estos nódulos se caracterizan por tener un meristema persistente y activo que genera continuamente nuevas células, resultando en nódulos maduros de forma cilíndrica (Vasse et al., 1990).

Los nódulos indeterminados presentan zonas claramente diferenciadas: la zona I o zona meristemática, la cual posee células indiferenciadas; la zona II o zona de infección, donde las bacterias son liberadas; la zona II-III o de transición, donde las bacterias se diferencian a bacteroides y la zona III o de fijación de nitrógeno (Timmers et al., 1999; Xiao et al., 2014). Luego de algunas semanas se puede distinguir una zona IV o zona de senescencia, en la cual las células bacterianas y vegetales degeneran (Figura 5). Las amidas glutamina y aspargina son los principales compuestos nitrogenados transportados desde los nódulos a la planta, aunque en ciertas leguminosas tropicales las areidas alantoína y el ácido alantoico hacen una contribución importante (Atkins et al., 1975).



**Figura 5**. **Esquema de la morfología de un nódulo indeterminado**. Células de la raíz que dan lugar a los diferentes tejidos del nódulo. Zonas de los nódulos indeterminadas maduros: I-meristema, II-zona de infección, II-III-zona intermedia entre la infección y las zonas de fijación de nitrógeno, III-zona de fijación de nitrógeno, IV- zona senescente donde las células vegetales y bacterianas degeneran. La imagen también esquematiza zonas de la arquitectura celular del nódulo: córtex, endodermis, parénquima y haces vasculares. Adaptado de Jhu & Oldroyd, 2023.

#### 7. Vías de señalización activadas por los rizobios en las raíces de las leguminosas

La percepción de los NFs es llevada a cabo por receptores presentes en la membrana plasmática de las células de la raíz. Estos son receptores de tipo quinasa con dominios extracelulares LysM (motivos de lisina), los cuales en el caso de *M. truncatula* han sido denominados LYK3 (*LysM Receptor Like Kinase 3*) y NFP (*Nod Factor Perception*) (Limpens et al., 2003; E. B. Madsen et al., 2003). Por otro lado, en *L. japonicus*, un receptor quinasa de tipo LysM, EPR3 (*ExoPolisacharide Receptor 3*), distingue los exopolisacáridos de rizobios compatibles e incompatibles en la epidermis mediante un mecanismo de infección cortical intracelular que mantiene a las bacterias encerradas en las membranas dentro de las células de la planta (Kawaharada et al., 2017).

Luego de la percepción del NF, se activa un receptor de tipo quinasa con repeticiones ricas en leucina (LRR), denominado DMI2 (Does not make infection 2) (Stracke et al., 2002) iniciando una cascada de transducción de señales que involucra uno o más canales iónicos presentes en la envoltura nuclear, como el canal de potasio DMI1 y los canales activados por nucleótidos cíclicos, así como otros componentes del complejo del poro nuclear (Charpentier et al., 2016). Esta activación de canales iónicos desencadena oscilaciones en la concentración de calcio dentro y alrededor del núcleo, conocidas como "calcium spiking" (Ehrhardt et al., 1996; Sieberer et al., 2009). Estas oscilaciones de calcio son decodificadas por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (DMI3 en *M. truncatula*) que fosforila e interacciona con el factor de transcripción IPD3/Cyclops (Messinese et al., 2007). IPD3/Cyclops activa directamente la transcripción del gen Nodule Inception (NIN), un factor de transcripción que actúa como un regulador central de la nodulación (Singh et al., 2014), dando inicio a una activación jerárquica de factores de transcripción, entre los que se encuentran Nodulation Signaling Pathway (NSP 1 y 2), las subunidades del complejo nuclear NF-Y y algunos miembros de la familia de AP2/ERF (Apetala2/Ethylene Response Factor) (Andriankaja et al., 2007; Baudin et al., 2015; Cerri et al., 2012; Laloum et al., 2014; Middleton et al., 2007; Zanetti et al., 2010). Estos factores de transcripción promueven la expresión de genes específicos de la nodulación temprana, llamados nodulinas o Early Nodulins (ENODs), dando lugar a la reprogramación del transcriptoma de las células de la raíz (Figura 6). La compleja regulación de NIN y Early Nodulin 11 (ENOD11) está mediada por los factores de transcripción de la familia GRAS NSP1 y NSP2, los cuales forman homo-y hetero-complejos que se unen a los promotores de los genes NIN y ENOD11 (Hirsch et al., 2009).

El estudio de mutantes deficientes en la nodulación ha revelado que las respuestas que ocurren en la epidermis pueden ser separadas de las que ocurren en el córtex, ya que la infección bacteriana puede ocurrir sin la formación del nódulo (Oldroyd et al., 2011) y por el otro lado, la organogénesis del nódulo puede ocurrir en ausencia de la bacteria (Tirichine et al., 2006). Por ejemplo, los factores de transcripción NSP1 y NSP2 son necesarios para la desdiferenciación de las células corticales que tiene lugar durante la formación del primordio del nódulo (Crespi et al., 2008). Por otra parte, el factor de transcripción NIN participa en las cascadas de señalización que se activan tanto en la epidermis como en el córtex de la raíz. En la epidermis, NIN restringe la expresión de *ENOD11* a través de la inhibición competitiva de ERN1, mientras que en el córtex la expresión de *NIN* es suficiente para promover la activación de la respuesta a citoquinina mediada por el receptor de citoquinina 1 (CRE1) (Vernie et al., 2015). Además, recientemente se demostró que los genes *NF-YA* son reguladores importantes de la señalización de auxinas durante el desarrollo de nódulos a través del control directo de los genes del factor de transcripción *SHORT INTERNODES/STYLISH* (STY) y sus blancos aguas abajo, *YUCCA1* y *YUCCA11* involucrado en la biosíntesis de auxinas (Shrestha et al., 2021).



**Figura 6. Factores de transcripción involucrados en la organogénesis del nódulo.** Los Factores Nod liberados por los rizobios son percibidos por los receptores NFP y LYK3 ubicados en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz. En respuesta se generan oscilaciones de calcio (*calcium spiking*) dentro y alrededor del núcleo. Para que tengan lugar las oscilaciones de calcio es requerido *DMI2*, entre otros. Las oscilaciones son decodificadas por la quinasa DMI3, la cual fosforila a IPD3, iniciando una activación jerárquica de los factores de transcripción NIN, NSP1/2, NF-Y, ERN1, que finaliza con la reprogramación celular requerida para la nodulación. En el córtex, las citoquininas son percibidas por el receptor CRE1, que activan a NSP1 y NSP2.

## 8. Función de las hormonas vegetales en la arquitectura de la raíz y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno

La palabra hormona se usa ampliamente para describir moléculas de señalización móviles que son capaces de generar respuestas o cambios en el desarrollo lejos del lugar donde fueron sintetizadas. Diversas hormonas vegetales han sido involucradas en la regulación de la simbiosis entre leguminosas y rizobios (Oldroyd et al., 2011), principalmente las citoquininas y las auxinas. Las hormonas vegetales coordinan el crecimiento de las raíces en respuesta a las señales de desarrollo (internas) y ambientales (externas). Las auxinas son importante en el crecimiento y el desarrollo de la raíz lateral, aunque también se ha demostrado la participación de otras fitohormonas y/o reguladores (Benková et al., 2003; De Smet et al., 2006; Ivanchenko et al., 2008; Laplaze et al., 2007; Negi et al., 2008; Péret et al., 2009).

El mecanismo de percepción y señalización mediado por auxinas involucra a receptores de auxinas de la familia TIR1/AFB F-box (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS), las proteínas represoras Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) y los factores de transcripción de respuesta a auxina ARFs (por sus siglas en inglés de Auxin Response Factors). En condiciones de bajas concentraciones de auxina, las proteínas Aux/IAA forman dímeros con factores de transcripción ARF, bloqueando así la actividad de los ARF activadores. La auxina intracelular es percibida por los receptores TIR1/AFB1-3 un componente integral de un complejo que media la ubiquitinación de las proteína Aux/IAA y su degradación por la vía del proteasoma 26S (Tiwari et al., 2001). Una vez liberados de las Aux/IAA, los ARF regulan la expresión de genes que responden a las auxinas (Figuras 7 A y 7 B). El modelo descripto sólo se aplica a los ARFs que actúan como activadores transcripcionales en respuesta auxinas. Para el caso de los ARFs que actúan como represores transcripcionales se han propuesto varios modelos: los ARFs represores podrían interaccionar con los ARFs activadores y reprimir la trascripción de sus genes targets o bien competir por los sitios de unión al DNA (Vernoux et al., 2011) (Figuras 7 C y 7 D). Alternativamente, los ARFs represores podrían homo o heterodimerizar y reclutar corepresores, como el represor transcripcional TOPLESS (TPL) (Causier et al., 2012)(Figura 7 E).



**Figura 7. Modelo de la acción de las auxinas sobre los genes de respuesta a auxina.** A. Cuando los niveles de auxina en la célula son bajos, la expresión de genes de respuesta a auxina es reprimida por un complejo compuesto de las proteínas Aux/IAA (verde) y los factores de transcripción ARF (coral) unido a los elementos de respuesta a auxina (AuxRE) que recluta al represor TPL (negro). B. Cuando los niveles de auxina aumentan, la auxina se une a los receptores TIR/AFB y estos al complejo SCF (violeta). Esto conduce a la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA y degradación por la vía del complejo proteasoma (celeste). Las proteínas Aux/IAA ya no pueden unirse a las proteínas ARF, se libera la represión y comienza la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Se esquematizan los dominios presentes en los factores de transcripción ARFs, el dominio DBD de unión al DNA, el dominio CTD que facilita la interacción con otros ARFs y con las proteínas Aux/IAA y una región no conservada MR (*Middle region*). C. Los ARFs represores (ARF R) podrían interactuar e inhibir la actividad de los ARFs activadores (ARF A), en presencia o ausencia de Aux/IAA y TLP. D. Los ARFs R podrían competir con los ARFs A por la unión a los sitios ARE. E. Los ARFs R unidos a los sitios ARE podrían interactuar con proteínas represoras, como TPL e inhibir la transcripción de sus genes *targets*. Adaptado de Li, 2016.

Varios mutantes *arf* de ganancia o pérdida de función muestran un inicio y/o desarrollo alterado de la raíz lateral (De Smet et al., 2006; Péret et al., 2009). Por ejemplo, los fenotipos en plantas mutantes *arf7/arf19* no presentan raíces laterales (Fukaki et al., 2002; Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005). Los patrones de expresión de los genes *ARF* y *Aux/IAA* varían y dependen del tejido y la etapa de desarrollo. Además de la respuesta de auxina, varios transportadores de auxina generan colectivamente una concentración de auxina máxima que es esencial en la determinación del número y la posición de las raíces laterales. Esto se demuestra mediante mutaciones en los sistemas de eflujo de auxinas dependientes de PIN y del TRANSPORTADOR DE CASSETTE ATP-BINDING PGP (Benková et al., 2003; Mravec et al., 2008) y en el mutante en el gen *AUXIN RESISTANT 1 (AUX1)* (De Smet et al., 2007; Laskowski et al., 2008; Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2008). También, se observan alteraciones de las raíces laterales cuando se altera químicamente el flujo de auxina con el inhibidor del transporte de auxina, ácido 1-N-

naftilftalámico (NPA) (Casimiro et al., 2001; Himanen et al., 2002; Vanneste et al., 2005). En todos estos casos se observaron cambios en la densidad de raíces laterales. A partir de estas observaciones se generó un modelo matemático que conecta la curvatura de la raíz, el transporte de auxinas y el inicio de la raíz lateral (Laskowski et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, la especificación de las células fundadoras se encuentra en una zona bien definida a lo largo del eje de la raíz principal donde el contenido y la respuesta a la auxina son mínimos (Dubrovsky et al., 2011). Estudios en la raíz principal donde se expresa la fusión del sensor de auxinas a un gen reportero (DR5:GUS) demostraron que esta activación local de la respuesta a auxina precede al inicio de los primordios de la raíz lateral, por lo que predice la posición de las raíces laterales a lo largo del eje de la raíz primaria (Dubrovsky et al., 2008; Moreno-Risueno et al., 2010). Específicamente, esta respuesta de auxina se produce en una o dos células del periciclo, lo que probablemente se asocia con un aumento en la concentración de auxina (Dubrovsky et al., 2008). De hecho, como se muestra a través de la producción de auxina estimulada localmente, un aumento local específico de la concentración de auxina en algunas células del periciclo es suficiente para el establecimiento de células fundadoras. Esto sugiere que la auxina actúa como un desencadenante morfogenético (Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008). El análisis de la acumulación de auxina activa durante la simbiosis entre leguminosas y rizobios utilizando los reporteros de auxinas DR5:GUS y GH3:GUS ha demostrado que el inicio de la formación de nódulos indeterminados requiere una disminución en los niveles de auxinas, para luego dar lugar a una acumulación máxima de auxinas en las células del periciclo y córtex en división del primordio nodular. Una vez formado el nódulo, las auxinas se restringen a la zona meristemática del nódulo y al tejido vascular (Mathesius et al., 2008). A su vez, la inhibición del transporte polar de auxinas, mediante el tratamiento de las raíces con NPA o TIBA (ácido 2,3,5-tri-iodobenzoico), resulta en la formación de pseudonódulos (Rightmyer & Long, 2011). Además, el tratamiento de raíces de M. truncatula con auxinas exógenas a bajas concentraciones (<10<sup>-7</sup>M de IAA, ácido indolacético) incrementa la nodulación; sin embargo, a concentraciones altas se inhibe la formación de nódulos (Bensmihen et al., 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación exógena de citoquininas en varias leguminosas produce efectos parecidos a la aplicación del NFs, incluyendo la activación de algunos marcadores tempranos de la nodulación como *ENOD40*, y en algunos casos provoca la formación de pseudonódulos (Cooper et al., 1994; Frugier et al., 2008; Heckmann et al., 2011). Se observó que en plantas mutantes de *L. japonicus* con ganancia de función del receptor de citoquinina *LHK1* (*Lotus Histidine Kinase Receptor 1*) se activa espontáneamente la formación de nódulos y

19

que la mutación de pérdida de función en *LHK1* bloquea la nodulación, pero no la infección bacteriana (Tirichine et al., 2007). En *M. truncatula* se encontró un ortólogo a *LHK1* denominado *CRE1* por *Cytokinin Receptor 1* (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Murray et al., 2007; Plet et al., 2011). El silenciamiento de este receptor genera insensibilidad de la raíz a las citoquininas, resultando en la reducción de la formación de nódulos. Las bases moleculares de cómo se vinculan la regulación por auxinas y citoquininas durante el desarrollo del nódulo permanecen aún inconclusas, aunque hay evidencias que sugieren que las citoquininas inhibirían el transporte polar de auxinas en las primeras etapas de la interacción. Las auxinas también interactúan con la vía de señalización del etileno durante la simbiosis de los nódulos de la raíz, ya que el mutante insensible al etileno *sickle (skl)*, que forma numerosos hilos de infección y nódulos en condiciones simbióticas (Penmetsa et al., 1997) también mostró alteraciones en el transporte de auxinas durante la nodulación (Prayitno et al., 2006).

En los últimos años, los análisis de transcriptómica han permitido identificar genes involucrados en la síntesis y señalización de hormonas necesarios en las etapas tempranas de la nodulación. Recientemente, la caracterización de los cambios en la expresión génica en repuesta al rizobio en los pelos radicales de *M. truncatula*, llevó a identificar genes de la señalización de citoquininas que se inducen frente al rizobio, entre ellos *CRE1*, los receptores en respuesta a citoquininas tipo A, RR2/3/4/8/10 y miembros de la familia LONELY GUY, *LOG1/2* necesarios para la activación de las citoquininas.

#### 9. Similitudes y diferencias entre órganos laterales en las raíces de leguminosas

Como se mencionó anteriormente, las raíces de leguminosas desarrollan dos tipos de órganos laterales post-embrionarios, las raíces laterales y los nódulos fijadores de nitrógeno. Ambos órganos se inician por la división de las células pericíclicas, endodérmicas y corticales internas en función de la acumulación local de auxina (Herrbach et al., 2014). Mientras que las raíces laterales se forman a partir de las células fundadoras caracterizadas por presentar una acumulación de auxina máxima oscilante periódicamente, no hay evidencia de que los nódulos se originen a partir de estas células fundadoras predefinidas (Moreno-Risueno et al., 2010). Además, los haces vasculares de las raíces laterales son centrales al igual que los haces vasculares de las raíces raíces principales, mientras que en los nódulos los haces vasculares se encuentran en la periferia del nódulo. Diversos trabajos han demostrado que las raíces laterales y los nódulos comparten programas de desarrollo superpuestos que convergen en la formación e interpretación de auxina máxima (Schiessl et al., 2019; Soyano et al, 2019). Varios genes y

factores de transcripción están involucrados en la regulación del desarrollo tanto de la raíz lateral como del nódulo. Por ejemplo, el factor de transcripción de la familia Lateral Organ Boundaries Domain de *M. truncatula MtLBD16* representa un punto de convergencia entre la formación de nódulos y raíces laterales (Schiessl et al., 2019). Estas similitudes sugieren que existen mecanismos reguladores compartidos y vías moleculares que gobiernan el desarrollo de raíces laterales y nódulos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que también existen diferencias claras en términos de genes específicos, redes de señalización e interacciones simbióticas involucradas en cada uno. La formación de nódulos y raíces laterales está regulada por diferentes mecanismos genéticos y moleculares. El desarrollo de nódulos está controlado principalmente por genes involucrados en la simbiosis planta-bacteria, como los genes Nodulation Signaling Pathway 1 (NSP1) y Nodule Inception (NIN). Por el contrario, el desarrollo de la raíz lateral está regulado por genes implicados en las vías de señalización hormonal, especialmente en respuesta a la concentración de auxinas y citoquininas. Estas diferencias resaltan las funciones especializadas y características distintivas de los nódulos y las raíces laterales en las plantas leguminosas: mientras que los nódulos participan en la fijación de nitrógeno a través de una relación simbiótica con los rizobios, las raíces laterales contribuyen a la absorción de nutrientes y agua del suelo.

#### 10. Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs)

Los ARFs constituyen una gran familia de factores de transcripción que median los programas de desarrollo regulados por auxinas en plantas. Los ARFs fueron identificados inicialmente gracias a su capacidad de unirse a las secuencias denominadas AREs (por sus siglas en inglés de *Auxin response elements*) que se encuentran presentes en los promotores de los genes de respuesta temprana a auxinas (Weijers & Wagner, 2016). Las cuatro primeras bases del sitio de reconocimiento para la unión de los ARF, TGTC, se encuentran siempre presentes, mientras que es posible que existan diferencias en las últimas dos bases que continúan a las cuatro anteriores (TGTC/TC, GC) (Li et al., 2016). Los ARFs poseen en el extremo N-terminal un dominio conservado de unión a DNA denominado DBD (*DNA binding domain*); y en el extremo C-terminal un dominio de dimerización conservado CTD (*C-terminal dimerization domain*). Este dominio CTD posee dos motivos denominados III y IV, que facilitan la interacción con otros ARFs y con las proteínas Aux/IAA. Entre ambos dominios se encuentra una región no conservada MR (*Middle region*) (Figura 7 A). El análisis funcional de estos dominios en protoplastos demostró que los ARFs con MRs ricas en glutaminas funcionan como activadores transcripcionales (Tiwari et al.,

2003). Por lo tanto, en base a la composición de la MR, los ARFs se han clasificado como represores o activadores transcripcionales. En *A. thaliana*, cinco proteínas ARFs están propuestas como activadoras y cinco como represoras, mientras que las catorce ARFs restantes están clasificadas como represoras por carecer del dominio CTD (Shen et al., 2015). Sin embargo, en la actualidad existe poca evidencia experimental *in vivo* que sustente esta clasificación y se han propuesto varios modelos de acción donde se postula que la activación o represión de la transcripción depende de la homo- y hetero-dimerización de los ARFs (Chandler et al., 2016; Korasick et al., 2014).

Dependiendo de la especie, los genomas de las plantas contienen un número variable de ARFs; por ejemplo, 23 miembros ARF en A. thaliana, 39 miembros en Populus trichocarpa, 25 miembros en Oryza sativa, 22 miembros en Zea mays (Finet et al., 2013), 24 miembros en M. truncatula, y 51 miembros en Glycine max (Shen et al., 2015). Un análisis filogenético completo de la familia ARF en todas las principales especies de plantas terrestres, incluidas las eudicotiledóneas, las monocotiledóneas, las gimnospermas y las briófitas, indicó que los genes ARF se dividen en tres clados principales: clado A, clado B y clado C (Finet et al., 2013). En A. thaliana, los activadores ARF se agruparon principalmente en el clado A (incluidos AtARF5, AtARF6, AtARF7 y AtARF8), mientras que la mayoría de los represores ARF se dividieron en los clados B (incluidos AtARF1, AtARF2, AtARF3, AtARF4 y AtARF9) y C (incluidos AtARF10, AtARF16 y AtARF17) (Finet et al., 2013). Muchos ARFs comparten patrones de expresión similares, como es el caso de ARF3 y ARF4, ARF6 y ARF8, ARF10 y ARF17, y ARF11 y ARF18 de A. thaliana. Algunos ARFs son específicos para respuestas particulares; por ejemplo, ARF1 y ARF2 regulan la senescencia floral (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005) y ARF7 y ARF19 regulan la expansión de la hoja y el desarrollo de la raíz lateral (Okushima et al., 2005; Teale et al., 2006; Wilmoth et al., 2005).

En *A. thaliana*, plantas mutantes simples en los genes *AtARF7* o *AtARF19* mostraron una leve reducción en el número de raíces laterales, mientras que los mutantes dobles *arf7/arf19* exhibieron una marcada reducción en el desarrollo de primordios de raíces laterales, lo que sugiere que estos dos miembros de la familia ARF podrían mostrar un cierto grado de redundancia en la iniciación de raíces laterales (Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005). AtARF5 también ha sido implicado en el desarrollo de raíces laterales, observándose que los mutantes con pérdida de función *arf5* mostraron una reducción sustancial en el número de raíces laterales emergidas, pero exhibieron un agrupamiento de primordios de raíces laterales. Esto sugiere que la formación de raíces laterales está sujeta a un control de respuesta de auxina bimodular: un primer módulo compuesto por AtARF7 y AtARF19 controla la iniciación de la raíz

22

lateral y se requiere un segundo módulo que involucre a AtARF5 para la organogénesis adecuada de las raíces laterales (De Smet et al., 2010). La evidencia genética reveló que otros miembros de ARF podrían funcionar como reguladores negativos del desarrollo de la raíz lateral. Por ejemplo, los mutantes dobles *arf10/arf16* de *A. thaliana* produjeron un mayor número de raíces laterales (Wang et al., 2005). Curiosamente, *ARF10, ARF16 y ARF17* también han sido involucrados en el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno y la infección por rizobios en leguminosas. La sobreexpresión del microRNA160, que regula post-transcripcionalmente a los transcriptos *ARF10, ARF16 y ARF17*, conduce a una reducción en la cantidad de nódulos en las raíces de *G. max* y *M. truncatula* (Bustos-Sanmamed et al, 2013; Nizampatnam et al., 2015; Turner et al., 2013). Además, tres mutantes con inserción del transposón *Tnt1* en el gen *arf16a* de *M. truncatula* exhibieron un número reducido de eventos de infección tras la inoculación con su par simbiótico *S. meliloti* (Breakspear et al., 2014).

## 11. La vía de miR390, tasiARFs, *ARFs* y su relación con el desarrollo de órganos laterales de la raíz

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNAs endógenos de 20 a 22 nucleótidos de largo que actúan como reguladores maestros de la expresión génica. Los genes que dan lugar a la biogénesis de miRNAs, denominados genes *MIR*, se localizan en regiones intergénicas a lo largo de todo el genoma. Estos son transcriptos por la RNA polimerasa II (Pol II) dando lugar a los llamados miRNAs primarios (pri-miRNA), los cuales forman una estructura de pliegue imperfecto que luego es procesado para dar lugar al precursor del miRNA, conocido como pre-miRNA, y luego al miRNA doble hebra maduro por acción de la nucleasa DICER-LIKE 1 (DCL1) y otras proteínas accesorias. Una de las hebras del miRNA se ensambla con una proteína del tipo ARGONAUTA (AGO) para formar un complejo ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA induced silencing complex*) que se une por complementariedad de bases a un mRNA *target*. La otra hebra del miRNA. La proteína AGO unida al miRNA puede actuar mediando el clivaje endonucleolítico del mRNA *target* o bien inhibiendo su traducción, llevando a que los niveles del producto proteico del gen *target* se reduzcan (Bartel et al., 2009; Voinnet et al., 2009).

El miR390 pertenece a la familia de miRNAs conservados en plantas y su *target* es el transcripto *trans-acting small interference RNA3 (TAS3)*, a partir del cual se generan RNAs secundarios que actúan en *trans* -denominados *trans-acting small interference RNAs* o tasiRNAs- por cortes endonucleolíticos en fase de a 21 nts a partir del sitio de clivaje de miR390 (Jagadeeswaran et

23

al., 2009; Marin et al., 2010). Estos tasiRNAs regulan a su vez los niveles de mRNAs que codifican los factores de transcripción ARF2, ARF3 y ARF4, y es por ello que se los ha designado como tasiARFs (Montgomery et al., 2008). En la Figura 8 se esquematiza el módulo compuesto por miR390, *TAS3*, tasiRNAs y los mRNAs que codifican ARF2, ARF3 y ARF4. Una vez generado el miR390, éste se ensambla con la proteína ARGONAUTA 7 (AGO7). Este complejo ribonucleoproteico se une en dos regiones del transcripto no codificante *TAS3* y se produce el clivaje en el sitio de unión más cercano al extremo 3' del transcripto. El producto 5' de clivaje del transcripto es reclutado por un complejo proteico compuesto por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR6) y el supresor de silenciamiento génico (SGS3). RDR6 sintetiza la segunda cadena de RNA dando lugar a un RNA doble cadena, el cual es procesado por DICER-LIKE 4 (DCL4) para dar lugar a los tasiARFs derivados de *TAS3*. Estos tasiARFs se asocian a AGO1 y actúan sobre los mRNA blanco *ARF2, ARF3* y *ARF4*, los cuales contienen uno o dos sitios de unión para los tasiARFs (Montgomery et al., 2008).



Figura 8. Esquema simplificado del modo de acción del módulo compuesto por el miR390, TAS3, los tasiARFs y los mRNAs ARF2, ARF3 y ARF4. El miR390 tiene como blanco de acción al transcripto TAS3. El clivaje del transcripto TAS3 mediado por ARGONAUTA 7 y guiado por miR390 en el sitio más próximo al extremo 3'resulta en la producción de tasiARFs, cuya producción requiere componentes de la ruta de la biogénesis de los siRNAs secundarios incluyendo SGS3, RDR6 y DCL4. A diferencia del miR390, los tasiARFs dirigen el clivaje de los mRNAs codificantes ARF2, ARF3 y ARF4.

Estudios previos del grupo de investigación de Biología de Raíz demostraron que el módulo miR390/*TAS3* está involucrado en la regulación del desarrollo de órganos laterales postembrionarios en las raíces de *M. truncatula*. La activación constitutiva de la vía miR390/*TAS3* mediante la sobreexpresión del precursor del miR390 (OX390) promueve el alargamiento de las raíces laterales, pero afecta negativamente la organogénesis de los nódulos y la infección por rizobios durante la simbiosis fijadora de nitrógeno establecida entre *M. truncatula* y *S. meliloti*. Además, la activación de la vía miR390/*TAS3* previene la inducción de *MtNSP1* y *MtNSP2* en respuesta al rizobio, mientras que la inducción de *MtNIN* ocurre normalmente (Figura 9) (Hobecker et al., 2017).



Figura 9. La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b afecta positivamente la elongación de raíces laterales y negativamente la iniciación de los eventos de infección y la formación de nódulos. A. Longitud de las raíces laterales (RL) cuantificadas en las plantas compuestas transformadas con el vector vacío (EV) u OX390. B. Nódulos formados por raíz transgénica en las plantas OX390 y EV a los 6, 9, 13 y 16 días post infección (dpi) con S. meliloti 1021. C. Cuantificación de ITs por centímetro de raíz (densidad) en las raíces EV y OX390 a los 5-6 dpi con S. meliloti marcado con RFP (Sm RFP). Los datos corresponden a la media ± el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 20 raíces por cada ensayo. Los asteriscos indican que los valores OX390 son significativamente diferentes de las EV en un test t-Student no apareado de dos colas con p>0.05 (\*). D. Los niveles de acumulación de MtNIN, MtNSP1 y MtNSP2 fueron cuantificados en las raíces transformadas con EV o en las raíces OX390 inoculadas con agua (mock) o con S. meliloti 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media ± el error estándar de dos réplicas biológicas independientes. Los niveles de los transcriptos fueron normalizados por los niveles del transcripto HIS3L. Los datos están expresados relativos a la condición control EV mock. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con p<0,05 (\*). Adaptado de Hobecker, 2017.

Por otro lado, plantas mutantes en el gen *ago7* o que expresan un *mimicry* que secuestra a miR390 e impide su acción sobre TAS3 (*MIM390*) presentaron un aumento en el número de nódulos y en la densidad de los eventos de infección comparado con las plantas WT. Además, la inducción de los factores de transcripción *MtNSP1* y *MtNSP2* en respuesta a *S. meliloti* fue mayor en mutantes *ago7* o en raíces que expresan *MIM390* comparada con la inducción en las raíces WT (Hobecker et al., 2017).

Se demostró que, en *M. truncatula*, existen dos variantes para el transcripto *TAS3*, uno largo denominado *TAS3* y uno corto denominado *ALT TAS3*. La isoforma larga *TAS3* es estabilizada mediante su asociación a polisomas, dando lugar a la producción de tasiARFs y a la represión post-transcripcional de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4* en raíces no inoculadas. Luego de la inoculación con *S. meliloti*, la isoforma corta *ALT TAS3* asociada a los polisomas actuaría como un *target* mimicry endógeno de miR390, reduciendo la producción de tasiARFs y liberando la represión de *MtARF2*, *MtARF4*, la cual es requerida para el progreso de la simbiosis. La sobreexpresión de la variante *TAS3* en las raíces genera un mayor número de nódulos y de eventos de infección con respecto al control (Traubenik et al., 2020). Sin embargo, la participación de los blancos de acción de la vía miR390/*TAS3*, es decir, *MtARF2*, *MtARF3*, *MtARF4a* y *MtARF4a* y *MtARF4b*, en el desarrollo de raíces y el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno y la hipótesis de que la vía miR390/*TAS3* estar actuando a través de dichos factores de transcripción, no habían sido exploradas hasta el desarrollo de la presente tesis doctoral.

#### 12. Genes LBD (Lateral Organ Boundaries-Domain)

Los genes LBD, son una familia de genes que codifican factores de transcripción específicos de plantas que contienen un dominio conservado llamado LOB (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES*). Los LBDs desempeñan funciones importantes en los procesos del crecimiento y desarrollo como la fotomorfogénesis y el desarrollo del pecíolo, así como también en la resistencia a patógenos, la respuesta a hormonas vegetales o ambientales y la regulación del metabolismo (Xu et al., 2016). AtLOB es uno de los primeros miembros identificados de la familia LBD en *A. thaliana*. Plantas mutantes en este gen *AtLOB* exhiben fusiones de órganos laterales en condiciones de crecimiento estándar (Husbands et al., 2007), mientras que su expresión ectópica altera el tamaño y la forma de las hojas, la polaridad adaxial-abaxial y causa esterilidad debido al desarrollo anormal de los órganos florales, sugiriendo su papel potencial en el desarrollo de
#### órganos laterales (Shuai et al., 2002).

Las proteínas LBD se componen de una región N-terminal relativamente conservada y una región C-terminal variable. La región N-terminal incluye el dominio LOB, que comprende un motivo similar a un dedo de zinc (CX2CX6CX3C) que media la unión al DNA, un bloque GAS (Gly-Ala-Ser) y un motivo en espiral similar a una cremallera de leucina (LX6LX3LX6L) responsable de la dimerización de proteínas. Estudios previos revelaron que un residuo de prolina conservado dentro del bloque GAS desempeña un papel fundamental en la función biológica de las proteínas LBD en *A. thaliana*. La región C-terminal confiere activación/represión transcripcional de la expresión de los genes *targets* de los LBDs (Zhang et al., 2020). El sitio de unión de los factores de transcripción LBD al DNA ha sido reportado como una secuencia consenso de 6 pb GCGGCG que se denominó motivo LBD. Dentro de este consenso, la secuencia central de 4 nucleótidos CGGC se conserva, mientras que existe divergencia en la primera (NCGGCG) o última base (GCGGCN) del motivo consenso (Husbands et al., 2007).

El genoma de A. thaliana contiene 42 genes que codifican proteínas LBD, las cuales participan en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la regulación transcripcional de la expresión génica (Iwakawa et al., 2002; Majer et al., 2011; Matsumura et al., 2009; Shuai et al., 2002). Según las similitudes de secuencia y análisis filogenético, sus miembros se clasificaron en dos clases principales, Clase I y Clase II. Las proteínas de la Clase I contienen motivos en forma de dedos de zinc, bloques de GAS y motivos en espiral en forma de cremallera de leucina, pudiéndose agrupar en cuatro clados (IA, IB, IC e IE), mientras que las proteínas LBD de Clase II, las cuales carecen de una cremallera de leucina intacta, se dividen en dos clados (IIA y IIB) (Zhang et al., 2020). Entre los miembros de la clase I de A. thaliana se incluyen 36 genes que codifican proteínas que son similares (25 % al 82 % de identidad) a AtLOB, el primer miembro de la familia identificado en A. thaliana (Shuai et al., 2002), en todo el dominio LOB. Por otra parte, la Clase II consta de seis genes que codifican proteínas menos similares a AtLOB (28 % al 33 % de identidad) (Shuai et al., 2002). Una característica distintiva de las proteínas de Clase II es que son más ricas en cisteínas (Cys) que las proteínas de Clase I; las proteínas de la Clase II contienen de nueve a trece residuos de Cys totales, mientras que las proteínas de Clase I contienen de cuatro a siete Cys (Shuai et al., 2002).

Estudios funcionales y evolutivos de los miembros de la familia LBD mostraron que los genes LBD que pertenecen a un mismo clado filogenético tienen funciones moleculares similares. Los miembros de la Clase IA están involucrados principalmente en la regulación del desarrollo de órganos aéreos (hojas, tallos, flores) y sus respuestas a estímulos ambientales relacionadas

27

(arquitectura de inflorescencia y fotomorfogénesis). En *A. thaliana*, AtLBD6, AtLBD36, AtLBD10 y AtLBD28 se clasifican en la Clase IA2. AtLBD6 puede formar complejos con diferentes proteínas para regular varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Chen et al., 2013; Guo et al., 2008; Iwakawa et al., 2002; Lin et al., 2003). Las proteínas LBD de la Clase IIB desempeñan funciones en el metabolismo del nitrógeno en *A. thaliana* y arroz. El número de genes estudiados en Clase IC y Clase IE es pequeño y su mecanismo molecular en la regulación transcripcional aún se desconoce (Zhang et al., 2020). Los miembros de la Clase IB, entre las cuales se encuentran AtLBD29, AtLBD17 y AtLBD16 de *A. thaliana*, han sido involucrados en la regulación del desarrollo de órganos subterráneos (raíces laterales, raíces de la corona y raíces adventicias) y en procesos biológicos regulados por auxinas, incluidos el desarrollo de las raíces, la formación de callos, la resistencia de las raíces a los patógenos de las plantas y el desarrollo de hojas y flores (Zhang et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, la formación de raíces laterales en *A. thaliana* está regulada por dos ARFs, AtARF7 y AtARF19. El mutante doble *arf7/arf19* está gravemente afectado en la formación de raíces laterales. El análisis de los genes cuya expresión estaba afectada en plantas *arf7/arf19* respecto de las WT reveló que ARF7 y ARF19 regulan directamente la transcripción mediada por auxina de *AtLBD16* y/o *AtLBD29* en raíces de *A. thaliana*. La sobreexpresión de *AtLBD16* y *AtLBD29* induce la formación de raíces laterales en ausencia de *ARF7* y *ARF19* (Okushima et al., 2007).

Además, *AtLBD29* se expresa en los primordios de raíz lateral (Okushima et al., 2007), mientras que *AtLBD16* se expresa a lo largo de toda la raíz lateral joven (Jagadeeswaran et al., 2009; Lee et al., 2009) y la expresión de *AtLBD18* se restringe a la base de la raíz lateral (Lee et al., 2009). También se ha demostrado que los LBD pueden homo y heterodimerizar. Por ejemplo, AtLBD18 forma un heterodímero con AtLBD33 que es necesario para la reactivación de la división celular dependiente de auxina (Soyano et al., 2008). Se demostró que los genes que codifican los transportadores de influjo de auxina *AUXIN1* (*AUX1*) y *LIKE-AUXIN3* (*LAX3*) son necesarios para la expresión inducida por auxina de *AtLBD16* y *AtLBD18* para controlar el desarrollo de la raíz lateral durante varias etapas en *A. thaliana* (Lee et al., 2015).. En las plantas leguminosas *M. truncatula* y *L. japonicus*, estudios recientes muestran que el gen *LBD16* es un componente común requerido y necesario para el desarrollo de raíces laterales y de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019). Sin embargo, se desconoce la función de otros miembros de esta amplia familia génica en plantas leguminosas y en particular, en procesos asociados a la simbiosis fijadora de nitrógeno.

# Hipótesis y objetivos

,

"No son nuestras habilidades las que muestran cómo somos, sino nuestras elecciones". Harry Potter de J. K. Rowling.

#### Hipótesis y objetivo general

Uno de los objetivos principales de la biotecnología moderna es lograr el incremento del rendimiento de los cultivos y reducir el impacto ambiental negativo que surge como consecuencia de la actividad humana. La disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo, principalmente nitrógeno, son los factores que mayor impacto tienen sobre el crecimiento de las plantas. Cambios en la disponibilidad de agua y nutrientes afectan la arquitectura de la raíz, principalmente el desarrollo de los órganos laterales y por lo tanto el crecimiento de la planta. Las plantas leguminosas desarrollan dos tipos de órganos laterales post-embrionarios en sus raíces: las raíces laterales, las cuales participan tanto en la captura de agua como de nutrientes, y los nódulos radicales, los cuales se forman como resultado de la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno del género Rhizobium. En los últimos 20 años se ha avanzado en la identificación de genes de la planta que participan de la vía de señalización requerida para la nodulación (Roy et al., 2020). Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos moleculares que regulan un proceso tan complejo que coordina la infección de la bacteria, el desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa y las señales del ambiente. Este conocimiento es esencial para establecer criterios racionales que permitan optimizar el proceso de FBN.

Los factores de transcripción ARF2, ARF3 y ARF4 son regulados a nivel post-transcripcional por la acción de pequeños RNAs. En particular, el módulo de miR390 y el transcripto *TAS3* resulta en la formación de pequeños RNAs que actúan en trans (tasiRNAs), los cuales regulan negativamente a los factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF2, ARF3 y ARF4 (Montgomery et al., 2008). Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la vía regula positivamente el crecimiento de las raíces laterales y negativamente la nodulación en plantas de *M. truncatula* (Hobecker et al., 2017). Las auxinas participan tanto en la formación y crecimiento de las raíces laterales (Marin et al., 2010) como en la infección rizobiana y organogénesis del nódulo (Breakspear et al., 2014).

A partir de un análisis transcriptómico se identificaron genes que aumentan su expresión en respuesta al rizobio en raíces control, pero cuya expresión no se veía alterada en respuesta al rizobio en las plantas que sobreexpresaban el miR390 (OX390). Uno de estos genes codifica para un miembro de la familia LBD que denominamos MtLBD17/29a, los cuales desempeñan funciones importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluido el desarrollo de la raíz.

30

En base a ello nuestra **hipótesis de trabajo** es que los factores de transcripción *MtARF2, MtARF3, MtARF4a/b* y *MtLBD17/29a* contribuirían a regular la sensibilidad y/o la respuesta a auxinas que controla el crecimiento de las raíces laterales y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas leguminosas y que *MtLBD17/29a* sería controlado directa o indirectamente por *MtARF2, MtARF3 y MtARF4*. En base a ello, en el presente trabajo de tesis doctoral nos proponemos como **objetivo general** dilucidar la función de los factores de transcripción de *MtARF2, MtARF3, MtARF4a/b y MtLBD17/29a* en el desarrollo de raíces laterales y nódulos fijadores de nitrógeno en plantas leguminosas con el objetivo a largo plazo de optimizar la fijación biológica de nitrógeno en sistemas agrícolas.

#### **Objetivos específicos**

## 1. Caracterizar funcionalmente los factores de transcripción *MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b* mediante:

-Análisis del fenotipo asociado a la arquitectura de raíz y a la nodulación de plantas de *M. truncatula* con niveles reducidos de los transcriptos *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* (*ARF2/3/4* RNAi) o bien de plantas mutantes en *MtARF4a* (*arf4a*).

## 2. Analizar los cambios transcriptómicos causados por la sobreexpresión del miR390 en etapas tempranas de la asociación simbiótica mediante:

-El mapeo de las lecturas obtenidas por RNA-seq a la nueva versión MtrunA17r5.0-ANR del genoma de *M. truncatula*, seguido de la identificación de aquellos genes expresados diferencialmente en respuesta a *S. meliloti* en raíces control y que sobrexpresan miR390.

#### 3. Caracterizar funcionalmente el factor de transcripción *MtLBD17/29a* mediante:

-Análisis del patrón espaciotemporal de expresión del gen que codifica al factor de transcripción *MtLBD17/29a* en distintos tejidos de raíces de *M. truncatula* y a distintos tiempos luego de la inoculación con su simbionte *S. meliloti*.

- Análisis del fenotipo asociado a la arquitectura de raíz y a la nodulación de plantas de *M. truncatula* mediante la sobreexpresión de *MtLBD17/29a* (OXLBD17/29a) o mediante silenciamiento del transcripto (*LBD17/29a* RNAi (1) y RNAi (2).

# Capítulo 1

"Trabajar duro es importante, pero hay algo que importa más, creer en ti mismo" Harry Potter de J. K. Rowling.

#### Resultados

### Análisis filogenético de la familia de factores de transcripción ARF de *A. thaliana* y *M. truncatula*

Para investigar las relaciones filogenéticas de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b de M. truncatula y aquellos descriptos de la planta dicotiledónea modelo A. thaliana, se generó un árbol filogenético que incluye la secuencia aminoacídica de todos los miembros de la familia ARF de A. thaliana (Breakspear et al., 2014; Finet et al., 2013; Hagen et al., 2002) y de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b de M. truncatula (Hobecker et al., 2017; Zhou et al., 2013). Además, el árbol filogenético incluyó también los miembros MtARF10, MtARF16 y MtARF17 de M. truncatula, los cuales han sido involucrados en el desarrollo de raíces y la formación de nódulos en esta leguminosa (Breakspear et al., 2014; Bustos-Sanmamed et al., 2013). Asimismo, se incluyeron a los mejores homólogos de *M. truncatula* de los miembros de la familia ARF implicados en el desarrollo de raíces laterales AtARF5, AtARF7 y AtARF19 (De Smet et al., 2010; Okushimaet al., 2005; Wilmoth et al., 2005), y en nodulación en soja, GmARF6 y GmARF8 (Wang et al., 2015). Las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia ARF de A. thaliana fueron descargadas de la versión TAIR10 del genoma de esta especie (www.arabidopsis.org), mientras que las de los miembros de M. truncatula fueron descargadas de la nueva versión del genoma de M. truncatula MtrunA17r5.0-ANR (Pecrix et al., 2018). Dichas secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal Omega para generar el árbol filogenético presentado en la Figura 10. Se observó que MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b se agruparon en los mismos clados que sus respectivos homólogos en A. thaliana. Este análisis indicó que mientras que en A. thaliana AtARF4 está representado por un único miembro, en M. truncatula existen dos miembros, MtARF4a y MtARF4b, sugiriendo que dicho gen sufrió una duplicación en esta leguminosa. En conjunto, estos resultados sugieren que MtARF2 y MtARF3 serían los ortólogos putativos de AtARF2 y AtARF3, mientras que MtARF4a y MtARF4b sería ortólogos putativos de AtARF4.



**Figura 10.** Árbol filogenético de la familia ARF de *A. thaliana* y *M. truncatula*. Las secuencias de aminoácidos de cada uno de los miembros de la familia ARF de *A. thaliana* se descargaron de la base de datos TAIR (https://www.arabidopsis.orf/). Los miembros de la familia ARF de *M. truncatula* vinculados al desarrollo de raíz o a la nodulación se descargaron de la versión recientemente publicada del genoma de *M. truncatula* MtrunA17r5.0-ANR (https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/, (Pecrix et al., 2018). El árbol se generó con el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizando el método *neighborjoining*. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Los clados de ARF2, ARF3 y ARF4a/b se etiquetaron con círculos color rosa, verde y azul, respectivamente.

También se verificó mediante análisis de sintenia que *MtARF2, MtARF4a* y *MtARF4b* poseen un origen evolutivo común con los genes *AtARF2* y *AtARF4* de *A. thaliana*. Dicho análisis de sintenia se realizó utilizando el sitio https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\_v3\_dicots/synteny/index y los identificadores de gen de la versión Mt4.0 del genoma de *M. truncatula*. No se pudo identificar un origen evolutivo en común para el gen *MtARF3* y *AtARF3* (Figura 11). A su vez, una consulta de los datos previos de sintenia entre *M. truncatula* y *A. thaliana* reportados por Reynoso et al (2019) arrojó los mismos resultados.



**Figura 11.** Análisis de sintenia de los genes *MtARF2, MtARF3, MtARFa y MtARF4b*. Los diferentes tipos de genes se indican con flechas y aquellos que pertenecen a la misma familia se indican con el mismo color. Se observa que el gen *MtARF2* posee dos genes flanqueantes en común unidos por líneas con *A. thaliana, MtARF4a* y *MtARF4b* tienen un solo gen en común unido por una línea con *A. thaliana*.

### Análisis de los niveles de transcriptos de *MtARF2, MtARF3, MtARF4a* y *MtARF4b* durante el desarrollo de raíces laterales y formación de nódulos en *M. truncatula*

Haciendo uso de datos de expresión generados mediante secuenciación masiva de RNA (RNAseq) por Schiessl y colaboradores (2019), se analizaron los niveles de acumulación de los transcriptos MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b durante el desarrollo de raíces laterales y formación de nódulos en M. truncatula. Los resultados indicaron que los niveles de MtARF4a son mayores a los 5 días post-inoculación (dpi) con una suspensión de S. meliloti con respecto a las raíces no inoculadas, mientras que los niveles de MtARF4b resultaron menores a todos los tiempos después de la inoculación respecto de las raíces no inoculadas. Estos datos coinciden con el análisis de expresión del promotor pMtARF4a, el cual es activo en los pelos radicales que contienen hilos de infección y en las células corticales alrededor de los pelos radicales infectados a los 6 dpi, así como también en aquellas células no infectadas del nódulo que rodean a las células infectadas (Hobecker et al., 2017). En cuanto a la expresión en raices laterales, se puede observar que los niveles de MtARF4a y MtARF4b disminuyen a las 12, 60 y 72 horas post inducción de raíces laterales (Figura 12), este análisis coincide con lo observado en estudios de expresión del promotor pMtARF4a en los cuales se detectó expresión de pMtARF4a en el tejido vascular y en los meristemas apicales (Kirolinko et al., 2021). Por otro lado, los niveles de expresión de MtARF3 fueron significativamente mayores en las raíces laterales completamente emergidas a las 72 horas después de la inducción de la formación de raíces laterales comparadas con raíces laterales más jóvenes, pero sus niveles de expresión fueron menores a los 7 días después de la inoculación puntual con S. meliloti comparada con tiempos de inoculación más tempranos. Estos datos coinciden con los análisis de expresión del promotor de pMtARF3 llevados a cabo previamente, los cuales demostraron que dicho promotor es activo en meristema de raíces laterales y principales, pero no durante la interacción simbiótica ya sea en etapas tempranas o tardías de interacción (Kirolinko et al., 2021) . Los niveles de MtARF2 se vieron reprimidos a las 60 y 72 horas post inducción de raices laterales, y también se vieron disminuidos sus niveles a distintos tiempos post inoculación con el rizobio



**Figura 12. Mapa de calor representado los niveles de transcripto de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b durante el desarrollo de raíces laterales y la formación de nódulos**. Se presentan los valores de expresión de los cambios de los niveles de transcriptos en escala en logaritmo en base 2 (Log2 *Fold Change*) a distintos tiempos después de la inducción de formación de la raíz lateral en comparación con no inducción de raíces laterales o tras la inoculación puntual con gotas de una suspensión de *S. meliloti* (*Spot-inoc*) en comparación con las raíces no inoculadas. Los datos se obtuvieron de Schiessl y colaboradores (2019), donde los genes con cambios de *Fold Change* > 1.5 se consideraron expresados diferencialmente. El asterisco indica diferencias significativas en cada tiempo entre las raíces laterales inducidas y las no inducidas o entre raíces inoculadas y raíces no inoculadas en un análisis de DE-seq con un valor de *p ajustado* <0,5.

## El aumento en los niveles de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3*, *MtARF4a* y *MtARF4b* en etapas tempranas de la interacción simbiótica es dependiente de *Factor Nod*

Estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que los niveles de los mensajeros de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF4a/b* y, en menor medida, *MtARF3* aumentaron en las raíces de *M. truncatula* a las 48 horas post inoculación con *S. meliloti* (Reynoso et al, 2013; Hobecker et al., 2017). Para investigar si los factores de nodulación y su vía de señalización eran responsables de la regulación positiva de este grupo de factores de transcripción de la familia ARF durante la simbiosis fijadora de nitrógeno, se trataron raíces de plantas WT (por sus siglas en ingles de *Wild Type*) con NF purificados de *S. meliloti* durante 48 horas. El análisis de acumulación de transcriptos se realizó mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Cabe mencionar que los oligonucleótidos utilizados para *MtARF4a* y *MtARF4b* producen la amplificación de ambos transcriptos, por lo que nos referiremos a los niveles de *MtARF4a/b*.

raíces tratadas con NF en comparación con las raíces control WT, mientras que el aumento fue de 12 veces para el transcripto *MtARF3* (Figura 13). Estos resultados indican que estos miembros de la familia ARF son regulados positivamente por el NF en WT.

Además, se determinaron los niveles de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b en plantas mutantes nfya1, una mutante con fenotipo de ITs defectuosos (Laporte et al., 2014), nfp, una mutante con pérdida de función en el gen NFP involucrado en la percepción de NF (Amor et al., 2003), skl una mutante insensible al etileno que presenta hipernodulación (Penmetsa et al., 1997) y ern-1, una mutante incapaz de iniciar y desarrollar ITs (Middleton et al., 2007). Los niveles de mRNAs de ninguno de estos ARF aumentaron significativamente luego del tratamiento con NF en el mutante nfp, aunque los niveles de MtARF2 y MtARF3 fueron ligeramente superiores en este mutante que en las plantas WT no inoculadas. Por otro lado, la regulación positiva de MtARF2 y MtARF3 o MtARF4a/b en respuesta a NF se anuló parcial o completamente, en mutantes nf-ya1. La regulación positiva de los niveles de mRNAs de MtARF2 y MtARF3 no se vio afectada en los mutantes ern-1 y skl, , aunque se pudo observar que los niveles de mRNAs de MtARF2 aumentaron en mayor medida en los mutantes skl en comparación con las plantas WT luego del tratamiento con NF, lo cual sería consistente con el mayor transporte de auxina observado en las mutantes skl (Prayitno et al., 2006). Además, la regulación positiva de MtARF4a/b en respuesta al tratamiento con NF se vio parcialmente afectada en el mutante ern1, pero no se vio afectada en el mutante skl (Figura 13). En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción de estos miembros de la familia ARF de M. truncatula, en particular de MtARF4a/b, depende de la percepción de NF y es dependiente del gen *MtNF-YA1*.



Figura 13. Los niveles de mRNA de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* son regulados positivamente por NF y dependen de *NFP* y *NF-YA1*. Los niveles de transcripción de A. *MtARF2*, B. *MtARF3* y C. *MtARF4a/b* se analizaron en tejido de raíz de plantas salvajes (WT) y plantas mutantes *nfp*, *nf-ya1*, *ern1* y *skl* tratadas con factores Nod purificados  $10^{-8}$  M (NF, barras azules) o *mock* (control inoculadas con agua, barras blancas) durante 48 horas. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR y se normalizaron a los niveles del transcrito *HISTONE 3-LIKE (HIS3L)*. Los valores se expresan en relación con la muestra *mock* WT, que se estableció en 1. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en un *test t*-Student de dos colas no apareado con un valor de p<0,05 (\*).

### Silenciamiento simultáneo de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* en raíces de *M. truncatula*

Para dilucidar la función de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b se generaron plantas con niveles reducidos de los mRNAs que codifican dichos factores de transcripción utilizando una

estrategia de silenciamiento postranscripcional basada en la expresión de un RNA de interferencia (RNAi). El fragmento de DNA utilizado para generar la construcción que denominamos ARF2/3/4 RNAi fue diseñado sobre la secuencia que contiene los sitios de unión de los tasiARF y fue clonado en el vector del sistema Gateway pK7GWIWG2(II) (Figura 14 A) (Karimi et al., 2007), que permite la expresión de un RNAi bajo el promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S para el silenciamiento génico postranscripcional simultaneo de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b (Figura 14 B). El vector confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen de resistencia a kanamicina bajo el promotor nos (nopalina sintasa) para su selección en plantas. Además, el vector posee el gen de la proteína verde fluorescente GFP bajo el control del promotor rolD como marcador reportero que permite visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopia de fluorescencia. Las construcciones conteniendo el fragmento ARF2/3/4 RNAi y el vector GUS RNAi (RNAi dirigido contra el transcripto que codifica la proteína β-glucuronidasa, o GUS), utilizado como control, fueron introducidas en la cepa Arqua1 de A. rhizogenes (Quandt et al., 1993) y las colonias positivas utilizadas para la transformación de las raíces de M. truncatula mediada por A. rhizogenes (Boisson-Dernier et al., 2001). Esta técnica permite la obtención de plantas compuestas que consisten en una parte aérea WT y un sistema radical transgénico.

Δ		Sitio target de los tasiARFS
~	M+ARE2	AGTAAGCATGGACCCTTTGCCCACTAGTCCTTTCCACAGGGTCTTGCAAGGTCAAGAATC
	M+ADE2	Т <mark>ССАСССТСАСАСТИЧЕССС</mark> ААТСАТТААСАТТСССА <u>ААССТСТАСААССТСААСА</u> АД
	MtARF5	
	IVITAR4a	
	MtARF4b	TGGGTTIATGGACTITGADGAGICTATAAGATCATCCAAGGTCITGCAAGGTCAAGAAAAA
	M+ARE2	ATCCACCTTCAGAGCAAATTTGGCTGAAACCAACCACTCTTACACTCCAGAGAAGTCTCT
	MtARE2	TARGCCCARGATACTOCCTARGACACTATTAATCCTCAGACTCCCCCCCTTATA
	MAARA	
	WITARF4D	
	MtARF2	TGCGTGCACTCCTGCAACTGATGAAGAAAAGAIGGATGCTGTTTCTACTTCAAGAAGGTA
	MtARF3	TGACCTAGGCAGGTGCTATCOTGCTTOAAACTGTTCCGGGATTGCTGCAACAGGAAA
	MtAR4a	TGAGTTGAGCACTTCAAGTCATCAAAAACCTTGCATCAACTGGAATAGEAAAAGT
	MtARF4h	TGATATCAATTCTCTAACACATACTAATCTTGCATCAAATCGAGCAAGAAA
	1110-010-12	
	MtARF2	TGGTTCAGAGAACTGCATGCCAATGTCAAGGCAGGAACCA <mark>ACGT</mark> ATTC <mark>GCA</mark> CCTTCTC
	MtARF3	AGAATGCACCOAGCGCCTTC
	MtAR4a	ACTTACTTACCTTCTCAGCTTA
	MtARF4b	<mark>ACTTCTCTGAGTTTAC</mark> GAG
		Sitio target de los tasiARFS
	MtARF2	Gegattregragraccoccereaagecaaacaraacatectractcaategecreta
	MtARF3	TGATTTTCCCTCTAATGCCATAGGCTTTCGTGAATCTTTCAGATTCCAAAAGGTCTTGCA
	MtAR4a	#GTTCATCCTTTCAGTTATGCAGGCTTTATGGAAAGTAACAACTTCCAAGGGTCTTGCA
	MtAKF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA
	MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA
	MtARF4b MtARF2	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCA
	MtARF4b MtARF2 MtARF3	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCA
	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCA
	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCAATATGAAAGG AGGTCAAGAAATTCTTCTGTGCCCACCCTACCGACGACGCCTCGTTTGACCAGGCCCG AGGTCAAGAAATTGTAAACTGAAATCCCTTTCAGGAAAAGTTGATTTCAACATTGGAGC AGGTCAAGAAATATATCCATTGAGAAATCCCTGACAGGAAAAGTTGATTTCAACATTGGAGC
в	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCAATATGAAAGG AGGTCAAGAAATTCTTCTGTGCCCACCCTACCGACGAGGCCTCGTTTGACGAGGCCCG AGGTCAAGAAATATGTAAACTGAAATCCCTTTCAGGAAAAGTTGATTTCAACATTGGAGC AGGTCAAGAAATATGTAAACTGAAATCCCTGCACGAAAAGTTGATCTAAACCTTAACTC
в	MtARF4 MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCGCTAAATTTCTTGCACTCCA
в	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
в	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
В	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCGGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
В	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATTCAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCCGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
в	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATT CAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCCGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
В	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATT CAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCCGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA
В	MtARF4b MtARF2 MtARF3 MtAR4a MtARF4b	GATT CAACCTTCTAGTTATGCAGACTTCACGGAAATGAACCCGTTTCCTAGGGTCTTGCA ATGCCACCTGGTCTGTCCCTAAATTTCTTGCACTCCA

**Figura 14.** A. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de *MtARF2, MtARF3, MtARF4a* y *MtARF4b*. En azul se muestran los sitios *target* de los tasiARFs y en verde los sitios elegidos para el diseño de *primers*. B. Esquema de la construcción *ARF2/3/4* RNAi que expresa un RNA de interferencia contra los transcriptos *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b*. Se esquematiza la región del T-DNA que es transferido e incorporado en el genoma de *M. truncatula*. RB y LB: bordes derecho e izquierdo del T-DNA respectivamente, Km: gen que confiere la resistencia a kanamicina, I: intrón.

Para evaluar si efectivamente la construcción *ARF2/3/4* RNAi produjo una reducción de los niveles de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b*, se colectaron las raíces transgénicas, se extrajo el RNA total y se llevó a cabo la cuantificación de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* mediante RT-qPCR. Se observó una disminución de los niveles de los transcriptos de más de 80 % para *MtARF2*, 70 % para *MtARF3* y más de un 90 % para *MtARF4a/b* en las raíces *ARF2/3/4* RNAi respecto a las raíces control *GUS* RNAi (Figura 15 A).

Para verificar si el silenciamiento de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* fue específico de estos miembros de la familia ARF, se procedió a medir por RT-qPCR los niveles de transcriptos de otros dos miembros de la familia ARF que han sido involucrados en el desarrollo de raíces laterales y nódulos, *MtARF16* y *MtARF19* (Figura 15 B). Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de *MtARF16* y *MtARF19* no se vieron afectados por la construcción *ARF2/3/4* RNAi, indicando la especificidad del RNAi generado. A partir de estos resultados pudimos concluir que la construcción *ARF2/3/4* RNAi produce la reducción de las transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* esperada y que dicho silenciamiento sería específico para estos miembros de la familia ARF.



Figura 15. Niveles de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3*, *MtARF4*, *MtARF16* y *MtARF19* en raíces de plantas *GUS* RNAi y *ARF2/3/4* RNAi. A. Niveles de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* en raíces de plantas *GUS* RNAi y *ARF2/3/4* RNAi. B. Niveles de los transcriptos *MtARF16* y *MtARF19* en raíces de plantas *GUS* RNAi y *ARF2/3/4* RNAi. Los niveles de los transcriptos se cuantificaron mediante RT-qPCR usando primers específicos para los transcriptos en raíces inoculadas con *S. meliloti* a las 48 horas post inoculación (ver Anexo 1). Los valores obtenidos se normalizaron por los valores del transcripto *HIS3L*. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,05 (\*) o p<0,01 (\*\*) en un *test t*-Student no apareado de dos colas entre las muestras *GUS* RNAi y *ARF2/3/4* RNAi.

### El silenciamiento de los factores de transcripción *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* afecta la formación de nódulos e hilos de infección en *M. truncatula*

Con el objetivo de estudiar la función de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b en el contexto de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno, se analizó el fenotipo asociado a la nodulación en las raíces de *M. truncatula* con niveles reducidos de los transcriptos *MtARF2, MtARF3, MtARF4a* y *MtARF4b*. Para ello, se inocularon las raíces *ARF2/3/4* RNAi y *GUS* RNAi con una suspensión de *S. meliloti* y se evaluó el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados por raíz transgénica a diferentes tiempos post-inoculación. El porcentaje de plantas *ARF2/3/4* RNAi noduladas fue menor respecto de las plantas control *GUS* RNAi a los 7, 11, 14, 17 y 21 días post-

inoculación (dpi), observándose la mayor diferencia a los 11 y 14 dpi, tiempos a los cuales se registró aproximadamente un 40 % menos de plantas con nódulos en *ARF2/3/4* RNAi comparado con las plantas *GUS* RNAi (Tabla 1).

dpi	<i>GUS</i> RNAi	<i>ARF2/3/4</i> RNAi
7	44/108 (40.8 %*)	21/134 (15.7 %)
11	80/108 (74.1 %)	45/134 (33.6 %)
14	85/108 (78.7 %)	56/134 (41.8 %)
17	88/108 (81.5 %)	74/134 (55.2 %)
21	96/108 (88.9 %)	84/134 (62.7 %)

Tabla 1. Número y porcentaje de plantas noduladas cuyas raíces fueron transformadas con las construcciones *GUS* RNAi o *ARF2/3/4* RNAi.

\*El porcentaje fue calculado como el número de plantas con nódulos dividido el número de plantas totales x 100 a los 7, 11, 14, 17 y 21 días post inoculación con *S. meliloti* 1021. dpi: días post-inoculación

Las cinéticas de nodulación (formación de nódulos en función del tiempo) mostraron que las raíces con niveles disminuidos de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* presentaron una reducción significativa en el número de nódulos formados por *S. meliloti* a todos los tiempos post inoculación analizados en este trabajo respecto a las raíces control. Esta reducción fue de aproximadamente un 60 % a los 7 y 11 dpi y de aproximadamente un 50 % a los 17 y 21 dpi (Figura 16 A). Estos resultados indican que el silenciamiento de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* afecta negativamente tanto el porcentaje de plantas noduladas como el número de nódulos en respuesta a la infección con *S. meliloti*. Sin embargo, el porcentaje de nódulos que adquirieron el color rosa característico de nódulos maduros causado por la expresión de leghemoglobina al inicio de la fijación de nitrógeno no se vio afectado por la reducción de *MtARF2*, *MtARF4a/b* (Figura 16 B). Lo observado en cuanto al porcentaje de plantas noduladas y el número de nódulos es coincidente con resultados propios del laboratorio, donde las plantas que sobreexpresaban miR390, y por consiguiente niveles de expresión reducidos de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b*, también presentaban una nodulación disminuida (Hobecker et al., 2017).



**Figura 16. El silenciamiento de los factores de transcripción** *MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b* produjo una disminución del número de nódulos. A. Cinética de nodulación. El número de nódulos formados en raíces control *GUS* RNAi (línea negra) y ARF2/3/4 RNAi (línea azul) fue cuantificado a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi con *S. meliloti*. B. Porcentaje de nódulos blancos (inmaduros y no fijadores) y rosados (maduros y fijadores de N<sub>2</sub>) formados a los 21 dpi en raíces transformadas con *ARF2/3/4* RNAi o el control *GUS* RNAi. En A y B los datos corresponden a la media ± SEM de tres réplicas biológicas independientes y los asteriscos indican que los valores de *ARF2/3/4* RNAi son estadísticamente significativos respecto al control *GUS* RNAi en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,001 (\*\*\*\*).

Considerando que el número de nódulos formados en raíces *ARF2/3/4* RNAi era menor comparado con el de las raíces control, se analizaron los eventos de infección rizobiana en etapas tempranas de la interacción. Con este fin se inocularon raíces *ARF2/3/4* RNAi y *GUS* RNAi con una cepa de *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente RFP y se cuantificaron los hilos de infección (ITs) por centímetro de raíz transgénica (densidad) mediante microscopía de fluorescencia. Las raíces *ARF2/3/4* RNAi mostraron una disminución de más del 20 % en la densidad de ITs respecto a las raíces control a los 7 días post inoculación (Figura 17 A).

Para evaluar la progresión de los eventos de infección se los clasificaron en distintos estadios: microcolonias dentro de los pelos curvados, ITs elongados dentro del pelo radical, ITs que se elongaron hacia las células epidérmicas y aquellos ITs que alcanzaron las células del córtex en división. Se observó un efecto notable en la progresión de los eventos de infección en las raíces *ARF2/3/4* RNAi, en las cuales el 58 % de los eventos de infección permanecieron en la etapa de microcolonia y sólo el 10 % de los ITs alcanzaron las células corticales en división, mientras que más del 50 % de los eventos de infección alcanzaron la base de las células epidérmicas o el tejido cortical en las raíces *GUS* RNAi (Figura 17 B). A partir de este análisis pudimos concluir que el silenciamiento de *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* afecta levemente la iniciación de los eventos de infección, y en mayor medida la progresión de dichos eventos en raíces de *M. truncatula*.



**Figura 17. El silenciamiento de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b** afecta la formación y progresión de los eventos de infección. A. Cuantificación de hilos de infección (ITs). Se presentan los ITs por centímetro de raíz en plantas *GUS* RNAi (blanco) y *ARF2/3/4* RNAi (azul). B. Porcentaje de eventos de infección que se encuentran en el estadio de microcolonia, ITs que se elongaron dentro del pelo radical, que alcanzaron la base de las células epidérmicas o el córtex en las raíces *ARF2/3/4* RNAi o *GUS* RNAi a los 7 dpi. En A y B los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 35 raíces por cada condición y ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,05 (\*) y p<0,01 (\*\*) en un *test t*-Student no apareado de dos colas entre las muestras.

Por otra parte, se analizó de qué manera el silenciamiento de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* afectaba el desarrollo de la parte aérea en plantas inoculadas con *S. meliloti*. Las plantas *ARF2/3/4* RNAi crecidas en ausencia de nitrógeno e inoculadas con el rizobio, exhibieron una reducción de aproximadamente un 50 % en el peso seco de la parte aérea en comparación con las plantas *GUS* RNAi a los 21 dpi con *S. meliloti* (Figura 18 A). A su vez se observó una leve, pero significativa, disminución en la longitud total de la parte aérea tomada desde el hipocótilo hasta el meristema apical (Figura 18 B). Esta reducción en el peso seco y longitud de la parte aérea podría deberse presumiblemente a la pobre nodulación y la disminución del proceso de infección que compromete la fijación de nitrógeno, y por lo tanto la disponibilidad de nitrógeno necesaria para el crecimiento y desarrollo de la parte aérea de la planta.



**Figura 18. El silenciamiento de** *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* afecta el desarrollo de la parte aérea. Medida de A. peso seco y B. longitud de la parte aérea medidos en plantas compuestas *GUS* y *ARF2/3/4* RNAi a los 21 días después de la inoculación con *S. meliloti*. Las barras de error representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas biológicas independientes con más de 15 plantas compuestas en cada experimento. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas compuestas *GUS* y *ARF2/3/4* RNAi en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05 (\*) y p<0,0001(\*\*\*\*).

### El silenciamiento de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* altera la expresión de los genes de nodulación en respuesta a *S. meliloti*

Dado que el silenciamiento de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b afectó la formación de nódulos y la infección bacteriana, nos propusimos investigar si la expresión de genes que forman parte de la vía de señalización de la nodulación y son cruciales para la formación de nódulos y la infección rizobiana, se veía afectada en plantas ARF2/3/4 RNAi. Entre los genes de nodulación seleccionados se incluyó a MtNF-YA1 (Soyano et al., 2013), MtNF-YC1 (Zanetti et al., 2010), MtERN1 (Andriankaja et al., 2007; Laloum et al., 2014; Middleton et al., 2007) y MtNSP2 (Kaló et al., 2005). Los niveles de los transcriptos de las subunidades A y C del factor de transcripción heterotrimérico NF-Y se acumularon a niveles significativamente mayores en aquellas raíces inoculadas con S. meliloti (inducción de más de 60 veces para MtNF-YA1 y de más de 100 veces para NF-YC1) sin diferencias significativas entre las raíces ARF2/3/4 RNAi y GUS RNAi (Figura 19). Se encontró un escenario similar para el transcripto de MtERN1, que se acumuló más de 10 veces tras la inoculación con S. meliloti tanto en las raíces ARF2/3/4 RNAi como en las raíces GUS RNAi. Los niveles de mRNAs del factor de transcripción de la vía de señalización de nodulación de tipo GRAS MtNSP2 aumentaron más de tres veces en las raíces GUS RNAi inoculadas con S. meliloti respecto de las raíces mock; sin embargo, la inducción de MtNSP2 luego de la inoculación con S. meliloti fue significativamente menor en las raíces de ARF2/3/4 RNAi que en las raíces de GUS RNAi. Estos resultados sugieren que MtARF2, MtARF3, MtARF4ay MtARF4b podrían ser necesarios para la activación completa de MtNSP2. Estos datos son coherentes con lo informado anteriormente por Hobecker et al. (2017), donde se muestra que la activación de la vía miR390/TAS3 por sobreexpresión del miR390, y consecuente reducción de los niveles de *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b*, afecta la inducción de los factores de transcripción *MtNSP1* y *MtNSP2* en respuesta a *S. meliloti.* 



**Figura 19. El silenciamiento simultáneo de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b interfiere con la regulación positiva de MtNSP2 por inoculación de rizobios**. Los niveles de transcriptos de marcadores de nodulación temprana *MtNF-YA1, MtNF-YC1, MtERN1* y *MtNSP2* en raíces *GUS* y *ARF2/3/4* RNAi a las 48 h post inoculación (hpi) con *S. meliloti* (Sm, barras azules) o *mock* (barras blancas control) se determinaron mediante RT-qPCR, se normalizó a *HIS3L* y se expresó en relación con la muestra control de *GUS* RNAi. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en un *test t-*Student no apareado de dos colas con un valor de p<0,05 (\*).

## Obtención y caracterización de una mutante con inserción del transposón *Tnt-1* en el gen *MtARF4a* (*arf4a*)

Teniendo en cuenta que el promotor de *MtARF4a* se activa durante la infección bacteriana y la formación de nódulos (Kirolinko et al., 2021) y que la regulación positiva de los niveles de mRNA *MtARF4a/b* se vio completamente afectada en mutantes en *nfp* y *nf-ya1*, analizamos el fenotipo simbiótico causado por una mutación en el gen *MtARF4a*. Las líneas fueron adquiridas a partir de la colección de mutante insercionales del transposón *Tnt-1* generadas por Tadege et al (2008) y disponible oportunamente a través de la Samuel Roberts Noble Foundation. La mutante

adquirida, NF17411, lleva una inserción de *Tnt-1* en el primer exón del gen *MtARF4a*, tal como se esquematiza en la Figura 20 A, por lo que se la designó como *arf4a*. Con el fin de evaluar si la mutante *arf4a* es una mutante nula, es decir que no acumula niveles del transcripto *MtARF4a*, se crecieron las plantas *arf4a* y plantas salvajes (WT) y se inocularon con agua (*mock*) o con *S. meliloti*. Luego se colectó el tejido de raíz y se determinaron los niveles de *MtARF4a* mediante RT-PCR semicuantitativa. En las raíces *arf4a* no se detectaron niveles de expresión del transcripto *MtARF4a*, mientras que en las raíces WT se observó acumulación de este transcripto tanto en las raíces *mock* como inoculadas con *S. melioti*, a la vez que los niveles del gen de referencia *HIS3L* fueron detectados en todas las muestras analizadas (Figura 20 B). Estos resultados indican que la línea NF17411/*arf4a* sería una mutante nula para el transcripto *MtARF4a*.



**Figura 20**. A. Representación esquemática del modelo del gen *MtARF4a* y la inserción del transposón *Tnt1* (panel superior). El modelo de gen se compone de 12 exones (bloques grises) y 11 intrones (líneas). La posición de la inserción de *Tnt1* dentro del primer exón en la línea mutante NF17411 se indica con una flecha negra. Las puntas de flechas negras indican la posición de los *primers* ARF4a F y ARF4a R específicos para MtARF4a (Anexo 1) utilizados para el análisis por RT-PCR. Se indican los codones de inicio (ATG) y terminación (TAG) de la traducción B. Los niveles de expresión de *MtARF4a* y *HIS3L* se determinaron mediante RT-PCR usando 35 y 25 ciclos, respectivamente, en raíces de plantas salvajes (WT) y mutantes NF17411 (*arf4a*) a 48 hpi con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*).

#### El gen *MtARF4a* es requerido para la nodulación y la infección por rizobio

Con el fin de analizar el rol de *MtARF4a* y su importancia para el establecimiento de la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno, se inocularon plantas mutantes *arf4a* y plantas WT con *S. meliloti* y se cuantifico el número de nódulos por raíz a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi. El mutante *arf4a* desarrolló un número significativamente menor de nódulos en comparación con las plantas WT a todos los tiempos analizados (Figura 21). Dicho resultado coincide con lo observado en las raíces de *ARF2/3/4* RNAi (ver Figura 16 A).



**Figura 21.** La mutación en el gen *MtARF4a* afecta negativamente la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*. Se cuantificaron los nódulos formados por raíz transgénica en plantas *arf4a* y WT como control a los 7, 11, 14 y 21 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media ± SEM y los asteriscos indican que los valores de *arf4a* son estadísticamente significativos respecto al control WT en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,0001 (\*\*\*\*).

Luego, evaluamos la densidad y la progresión de los eventos de infección tal como se describió previamente. Las raíces de los mutantes *arf4a* exhibieron una reducción significativa en la densidad de los eventos de infección (Figura 22 A). En cuanto a la progresión, en los mutantes *arf4a*, el 45 % de los eventos de infección permanecieron en la etapa de microcolonia y sólo el 20 % alcanzó el córtex de la raíz, mientras que en las raíces WT, casi el 55 % de los eventos de infección alcanzaron las células corticales (Figura 22 B). Estos resultados indican que la mutación de *MtARF4a* afecta tanto la densidad como la progresión de los eventos de infección, lo cual coincide con lo observado en las raíces *ARF2/3/4* RNAi.



**Figura 22. La mutación en** *MtARF4* **afecta negativamente los eventos de infección en raíces de** *M.* **truncatula.** A. Densidad de eventos de infección desarrollados en raíces WT y *arf4a* a 7 dpi. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas, cada una realizada con al menos 10 plantas. B. Progresión de los eventos de infección en raíces WT y *arf4a*. Los eventos de infección se clasificaron como microcolonias o ITs que terminan en el pelo de la raíz, en células epidérmicas o que llegan a la corteza a los 7 dpi. Cada categoría se presenta como el porcentaje del total de eventos de infección. Los resultados son representativos de tres réplicas biológicas, cada una con más de 14 plantas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las raíces mutantes WT y *arf4a* en un *test t*-Student no apareado de dos colas con un valor de p<0,05 (\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*).

Las plantas *arf4a* cultivadas en ausencia de nitrógeno también exhibieron una reducción en la longitud de la parte aérea y en su peso seco en comparación con las plantas WT en condiciones simbióticas (Figuras 23 A y B). Esto podría ser debido a un efecto indirecto causado por la reducción en el número de nódulos fijadores de nitrógeno, como también a un efecto directo de la ausencia de transcriptos de *MtARF4a* en la parte aérea.



**Figura 23. La mutación en** *arf4a* **afecta el desarrollo de la parte aérea.** A. Peso seco y B. Longitud de parte aérea medidos en plantas WT y *arf4a* crecidas en agar-Fahraeus sin nitrógeno a 21 dpi con *S. meliloti*. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas, cada una realizada con más de 10 plantas. Cuatro asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las raíces mutantes WT y *arf4a* en un *test t*-Student de dos colas no apareado con un valor de p<0,0001 (\*\*\*\*).

### El silenciamiento de los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* regula negativamente la longitud de las raíces principales y laterales

Teniendo en cuenta que estudios recientes sugieren que genes necesarios para el desarrollo de las raíces laterales fueron cooptados para el programa de nodulación en las plantas leguminosas, incluidas los que participan en la biosíntesis, la señalización y las respuestas de las auxinas (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019), se decidió investigar si el silenciamiento de los transcriptos MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b afectaba la arquitectura de la raíz en M. truncatula. Se cuantificó la longitud de las raíces principales y raíces laterales, así como también el número de raíces laterales emergidas por centímetro de raíz principal (densidad de raíces laterales) en plantas ARF2/3/4 RNAi y GUS RNAi crecidas durante 15 días en medio Fahraeus suplementado con KNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. Se observó que la longitud promedio de raíces laterales y raíces principales en las plantas ARF2/3/4 RNAi fue drásticamente menor que la longitud promedio de las plantas control GUS RNAi (Figuras 24 A y 24 B). También se observó un aumento en la densidad de raíces laterales en comparación con las raíces GUS RNAi (Figura 24 C). Por otro lado, para investigar si el fenotipo de raíz observado era debido a la elongación de las células o si afectaba el número de células, se observaron en el microscopio confocal de fluorescencia las células de la la zona de elongación de las raíces GUS RNAi y ARF2/3/4 RNAi, las cuales a su vez expresan constitutivamente la proteína GFP. No se observaron diferencias en los tamaños de las células, pero si se observó una reducción significativa en el número de células de las raíces ARF2/3/4 RNAi respecto de las raíces control GUS RNAi (Figuras 24 D, 24 E y 24 G).



Figura 24. El silenciamiento de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b altera la arquitectura raíz. Se midió la longitud de las A. raíces principales (RPs), B. raíces laterales (RLs) y C. la densidad de las raíces laterales en raíces GUS y ARF2/3/4a/b RNAi 15 días después de trasplantadas a cajas de petri conteniendo medio agar-Fahraeus suplementado con KNO₃ 8 mM. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas independientes con más de 20 raíces en cada experimento. D. Longitud de células de la raíz principal en la zona de elongación de raíces transformadas con ARF2/3/4a/4b RNAi o GUS RNAi. E. Número de células de la raíz principal en la zona de elongación de raíces transformadas con ARF2/3/4a/4b RNAi y GUS RNAi. Cada raíz que emergió directamente del sitio inoculado con A. rhizogenes se consideró una raíz principal transgénica independiente, mientras que las raíces de primer orden que emergieron de cada raíz principal transgénica independiente se consideraron raíces laterales. Cuatro asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas compuestas GUS y ARF2/3/4a/4b RNAi en un test t-Student no apareado de dos colas con un valor de p<0,0001. F. Imagen de plantas compuestas GUS y ARF2/3/4a/4b RNAi que ilustran las raíces principales y raíces laterales más cortas y la mayor densidad de raíces laterales observadas en las raíces ARF2/3/4a/4b RNAi. G. Fotos de microscopía confocal que ilustran la zona de elongación de raíces transformadas con las construcciones GUS RNAi y ARF2/3/4 RNAi. Dichas construcciones llevan a su vez el gen GFP bajo el control del promotor rolD para la visualización de las raíces transgénicas por microscopía de fluorescencia, las flechas indican la zona de elongación.

Por otro lado, se analizó si el efecto observado en las raíces alteraba el desarrollo de la parte aérea de la planta midiendo su peso seco. Se pudo observar que el peso seco de la parte aérea

se redujo en las plantas silenciadas en *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* (Figura 25). Esto puede deberse al crecimiento limitado de las raíces principales y raíces laterales, aunque no es posible descartar un efecto causado por la movilización de siRNAs derivados de la construcción *ARF2/3/4a/b* RNAi desde la raíz a la parte aérea.



**Figura 25. El silenciamiento de MtARF2, MtARF3, MtARF4a/b afecta el desarrollo de la parte aérea**. Peso seco de la parte aérea en plantas compuestas *GUS* RNAi y *ARF2/3/4* RNAi 15 días después de pasarlas a placas de Petri cuadradas con medio de agar-Fahraeus inclinado suplementado con KNO<sub>3</sub> 8 mM. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas independientes con más de 15 plantas compuestas en cada experimento. Cuatro asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas compuestas *GUS* y *ARF2/3/4* RNAi en un *test t*-Student no apareado de dos colas con un valor de p<0,0001 (\*\*\*\*).

En la introducción detallamos de qué manera las hormonas, y en particular las auxinas, se encuentran involucradas en el control de la arquitectura de raíz en las plantas. Las auxinas limitan el crecimiento de la raíz principal y por lo tanto, la determinación de la longitud de la raíz principal luego de la aplicación exógena de auxinas es utilizado como una medida de la sensibilidad a auxinas (Rahman et al., 2007). En estudios previos se observó que plantas que sobreexpresaban el miR390 eran más sensibles a las auxinas aplicadas de manera exógena que las raíces control que no sobreexpresaban miR390 (Hobecker et al., 2017). Para evaluar si el silenciamiento de los transcriptos MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b producía un cambio en la sensibilidad de la planta a la auxina se traspasaron las plantas GUS RNAi y ARF2/3/4 RNAi a medio Fahraeus suplementado con nitrógeno como control y con 10 μM de IAA. Al cabo de 15 días se determinó el crecimiento de las raíces principales. Tanto las raíces ARF2/3/4 RNAi y las GUS RNAi crecidas en 10 µM de IAA mostraron una inhibición del crecimiento de las raíces principales con respecto a las raíces no tratadas con auxinas; sin embargo, se observó una menor inhibición del crecimiento en las raíces ARF2/3/4 RNAi que en las GUS RNAi (Figura 26). Esta menor inhibición puede ser consecuencia del limitado crecimiento que presentan las raíces principales ARF2/3/4 RNAi previo a la aplicación de auxina exógena.



**Figura 26.** Las raíces *ARF2/3/4* RNAi son más sensibles a las auxinas exógenas. Longitud de las raíces principales cuantificadas en las plantas *ARF2/3/4* RNAi y *GUS* RNAi luego del tratamiento con 10  $\mu$ M de IAA o Fahraeus como control. Los datos son representativos de dos réplicas biológicas independientes con más de 14 raíces por ensayo. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar y los asteriscos indican las diferencias significativas entre las muestras en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05 (\*) y p<0,01 (\*\*).

#### MtARF4a es requerido para el desarrollo de la raíz de M. truncatula

Para evaluar el posible efecto de la mutación de *MtARF4a* sobre la arquitectura de raíz, se crecieron las plantas mutantes *arf4a* y WT en medio *Fahraeus* suplementado con nitrógeno. Luego de 7 o de 15 días de germinadas, se cuantificaron las longitudes de las raíces principales, raíces laterales y la densidad de raíces laterales (número de RLs/centímetro de raíz principal). Se observó que la longitud de las raíces laterales y de las raíces principales en las plantas mutantes *arfa4* fue significativamente menor que la longitud de las plantas WT (Figuras 27 A, 27 B, 27 D y 27 E), mientras que la densidad de raíces laterales fue mayor en las plantas mutantes en comparación con las plantas WT a ambos tiempos postgerminación (Figura 27 C y 27 F). Estos resultados son consistentes con los descriptos previamente en las raíces *ARF2/3/4* RNAi, e indica que *MtARF4a* podría actuar como un modulador que promueve la elongación de las raíces primarias y laterales, pero limita la formación de nuevas raíces laterales en *M. truncatula*.



**Figura 27. El mutante** *arf4a* **presenta alteraciones en el desarrollo de raíces.** Se midieron la longitud de raíz principal (A y D), la raíz lateral (B y E) y densidad de la raíz lateral (C y F) en plantas WT y mutantes *arf4a* a los 7 días (panel superior) y 15 días (panel inferior) después de la germinación (ddg). Las plantas se cultivaron en medio agar-fahraeus inclinado suplementado con KNO<sub>3</sub> 8 mM. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas, cada una con al menos 10 plantas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas WT y *arf4a* en un *test t*-Student de dos colas no apareado con p<0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*). G. Imagen de plantas mutantes *arf4a* y WT a los 15 ddg que ilustran las raíces primarias y laterales más cortas observadas en las raíces *arf4a*.

También evaluamos el efecto de la mutación en *arf4a* en la parte aérea de las plantas. Pudimos observar que la longitud de la parte aérea en las mutantes *arf4a* era menor en comparación con las plantas WT y el número de hojas verdaderas también fue menor en las plantas *arf4a* en comparación con las plantas WT a los 7 días después de la germinación (Figuras 28 A y 28 B). Además, en las plantas de 15 días después de germinadas, la forma y la separación de órganos de las hojas trifoliadas también se vio afectada en los mutantes *arf4a*, con folíolos más cercanos entre sí en comparación con las plantas WT (Figura 28 C). Este fenotipo en parte aérea no se observó en las plantas compuestas que expresan la construcción *ARF2/3/4* RNAi en sus raíces, sugiriendo que este efecto es causado por la mutación del gen MtARF4a en la parte aérea y no una consecuencia de la alteración en el sistema radical. En conjunto, los resultados indican que la parte aérea en *M. truncatula*. Un patrón foliar alterado se observó previamente en plantas mutantes de *ago7* de *M. truncatula*, que exhiben niveles aumentados de *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* (Zhou et al., 2013), así como en plantas que sobreexpresan ARF3 (Peng et al., 2017),

las cuales exhibian una mayor separación de los folíolos que en las plantas WT, fenotipo contrario a lo que observamos en la mutante *arf4a*.



**Figura 28. El mutante** *arf4a* presenta alteraciones en el desarrollo de la parte aérea. A. Longitud de la parte aérea y B. Número de hojas verdaderas se midieron en plantas WT y mutantes *arf4a* a los 7 días después de la germinación (ddg). Las plantas se cultivaron en medio agar-fahraeus inclinado suplementado con KNO<sub>3</sub> 8 mM. Las barras de error representan la media ± SE de tres réplicas biológicas, cada una con al menos 10 plantas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas WT y *arf4a* en un *test t*-Student de dos colas no apareado con y p<0,0001 (\*\*\*\*). C. Imagen de plantas mutantes *arf4a* y WT a los 7 días que ilustran la reducción de la longitud de la parte aérea y el número de hojas, así como la menor separación de los folíolos.

#### Discusión

### *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* controlan la organogénesis de los nódulos y la arquitectura de la raíz

La biosíntesis, la señalización y la respuesta a las auxinas son eventos cruciales para los programas de desarrollo que controlan la arquitectura de la raíz y la formación de nódulos simbióticos (Overvoorde et al., 2010; Reynoso et al., 2013). Diferentes evidencias sugieren que existen superposiciones entre los componentes de señalización y los procesos de desarrollo que conducen a la formación de raíces lateral y nódulos, incluidos los activados por auxina; sin embargo, también existen diferencias notables entre ambos procesos (revisado por Kohlen et al., 2018). Distintos miembros de la familia ARF modulan la arguitectura de la raíz en especies leguminosas y no leguminosas, algunas de las cuales promueven el desarrollo del sistema radical de la raíz, mientras que otras ejercen efectos inhibidores en su desarrollo. En este trabajo de tesis doctoral, encontramos que las raíces de M. truncatula con niveles reducidos de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b o un mutante arf4a exhibieron raíces principales y laterales más cortas, pero una mayor densidad de raíces laterales, lo que sugiere que estos ARFs podrían funcionar promoviendo la elongación de las raíces principales y laterales e inhibiendo la iniciación de nuevas raíces laterales. Se ha reportado previamente que la sobreexpresión de miR390, la cual causa una reducción de los niveles de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b, promueve el alargamiento de las raíces laterales sin afectar la longitud de la raíz principal y la densidad de la raíz lateral (Hobecker et al., 2017). Esto sugiere que miR390 podría mediar el crecimiento de la raíz lateral actuando a través de una vía que es independiente de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b o que la reducción drástica en los tres niveles de transcripto de estos miembros de la familia ARF causada por la expresión de un RNAi (70–90 % dependiendo del factor de transcripción ARF) o niveles nulos en arf4a dan como resultado un fenotipo de raíz distinto y más penetrante que la activación de la vía miR390/TAS3 por sobreexpresión de miR390, la cual redujo los niveles de mRNAs de las ARFs sólo en un 50-80 % (Hobecker et al., 2017). El fenotipo observado aquí en *M. truncatula* contrasta también con el descrito previamente por Marin et al. (2010) en A. thaliana, donde los autores demostraron que las plantas que expresan un miRNA artificial que silencia simultáneamente los tres ARF, AtARF2, AtARF3 y AtARF4, exhiben raíces laterales más largas. Además, los mutantes individuales de A. thaliana arf2, arf3 y arf4 mostraron una leve mejora en la longitud de la raíz principal y lateral en comparación con las plantas WT, mientras que los mutantes arf3 y arf4 tenían una densidad

de raíz lateral reducida (Marin et al., 2010). Por otro lado, la expresión de un RNA de interferencia que se dirige a PtARF4 en Populus Trichocarpa aumentó tanto la longitud como la densidad de la raíz lateral en condiciones normales o de estrés salino (He et al., 2018), mientras que la sobreexpresión de OsTAS3 en O. sativa, que resulta en una reducción en los niveles de los ARFs, produjo mayor densidad de raíces laterales (Lu et al., 2018). Por lo tanto, existen evidencias de que distintas especies de plantas modifican de manera diferente su arquitectura de raíz como consecuencia de la reducción o pérdida de los niveles de ARF2, ARF3 y/o ARF4. Estos mecanismos de determinación específicos de la especie se han observado previamente en el desarrollo de la hoja, donde la alteración en la producción de tasiARF da como resultado una respuesta fenotípica muy variable según la especie, como hojas fibrosas en tomate (Yifhar et al., 2012), hojas cilíndricas en O. sativa (Douglas et al., 2010), número reducido de folíolos en L. japonicus (Yan et al., 2010), y margen de la hoja lobulado y órganos laterales ampliamente espaciados en M. truncatula (Zhou et al., 2013). También se ha observado una variación fenotípica específica de la especie en la arquitectura de la raíz en respuesta a la falta o reducción de los niveles de otros miembros de la familia, como ARF10, ARF16 y ARF17, que son reprimidos post transcripcionalmente por el miRNA miR160. En A. thaliana, un doble mutante arf10/arf16 o una línea que sobreexpresa miR160 desarrolló más raíces laterales y mostró una reducción del crecimiento de la raíz principal (Mallory et al., 2005; Wilmoth et al., 2005), mientras que la reducción de los niveles de ARF10/16/17 por la sobreexpresión de miR160 en M. truncatula no alteró la formación o elongación de la raíz lateral, sino que afectó el crecimiento de la raíz principal al alterar la organización del meristema apical de la raíz (Bustos-Sanmamed et al., 2013).

Durante la simbiosis, los miembros de la familia ARF ejercen roles positivos o negativos sobre el número de nódulos y la infección por rizobios. Los factores de transcripción GmARF8a y GmARF8b funcionan como reguladores negativos de la formación de nódulos en *G. max* (Wang et al., 2015). Por otro lado, GmARF10, GmARF16 y GmARF17, actúan como reguladores positivos de la formación de nódulos en especies formadoras de nódulos determinados e indeterminados como son *G. max* (Nizampatnam et al., 2015; Turner et al., 2013) y *M. truncatula* (Bustos-Sanmamed et al., 2013), respectivamente. Aquí, demostramos que los miembros MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b pertenecen al clado B de la familia ARF y que los mismos son necesarios para la formación y el desarrollo adecuados de nódulos en *M. truncatula*. Esto indica que, además de los miembros del clado C (como ARF10, ARF16 y ARF17), los miembros del clado B como MtARF2, MtARF3, MtARF3, MtARF4a y MtARF4a y MtARF4b actuarían como reguladores positivos de la formación de nódulos indeterminados. Estos resultados concuerdan con lo observado

previamente por sobreexpresión de miR390 en M. truncatula (Hobecker et al., 2017). Aunque nuestra estrategia de RNAi silenció efectivamente a MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b, los datos de expresión indicaron que MtARF4a era el principal ARF activado transcripcionalmente por los rizobios entre estos miembros de la familia ARF. Desafortunadamente, la gran similitud de las secuencias de nucleótidos de las transcriptos MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b hizo inviable diseñar construcciones de RNAi específicas para cada miembro, lo que nos impidió diseccionar la contribución individual de MtARF2, MtARF3 y MtARF4b al fenotipo observado en la arquitectura de la raíz y de la nodulación. Sin embargo, el mutante arf4a mostró un fenotipo de nodulación muy similar al observado por el silenciamiento simultáneo de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b, lo que sugiere que MtARF4a tiene una función preponderante en la formación de nódulos. Esta reducción en el número de nódulos observada en las raíces de ARF2/3/4 RNAi o en el mutante arf4a podría deberse a una disminución en la señalización y respuesta de auxina, que también se correlaciona con la reactivación de las divisiones celulares en la corteza de la raíz que promueven la organogénesis de los nódulos (Kohlen et al., 2018). Se ha demostrado en P. vulgaris, una especie que forma nódulos de tipo determinados, que la sobreexpresión de miR390 tiene efectos negativos sobre la formación de nódulos y la infección por rizobios (Castaingts et al., 2022). Sin embargo, en L. japonicus, que también desarrolla nódulos determinados, se ha sugerido que los miembros de la familia ARF LjARF2, LjARF3 y LjARF4 pueden actuar potencialmente como reguladores negativos de la nodulación en L. japonicus, ya que su expresión aumenta en plantas mutantes leaflet3/argonaute7 (rel3/ago7), las cuales muestran un fenotipo de nodulación reducido (Li et al., 2014). Los resultados contrastantes encontrados en P. vulgaris (Castaingts et al., 2022) y M. truncatula (Hobecker et al., 2017 y esta tesis) y aquellos reportados en *L. japonicus* (Li et al., 2014) sugieren que la función de estos ARF en la nodulación también podría estar sujeta a los mecanismos específicos de la especie. Ciertamente un análisis más profundo en otras especies de leguminosas ayudará a dilucidar si el modo de acción de estos ARF es diferente en especies formadoras de nódulos determinadas e indeterminadas.

La posibilidad de que el fenotipo simbiótico observado en los mutantes *arf4a* pueda ser una consecuencia de la alteración en la arquitectura de la raíz y/o el desarrollo de la parte aérea no puede ser excluida. Sin embargo, el fenotipo de nodulación de los mutantes *arf4a*, con una reducción de más del 70 % en el número de nódulos en comparación con WT, fue más severo que el fenotipo de la arquitectura de la raíz, donde la longitud de la raíz lateral se redujo sólo en un 20 %, pero el número de raíces laterales se incrementó un 35 % en comparación con las plantas WT. Teniendo en cuenta que los nódulos se forman principalmente en las raíces laterales, el sistema total de raíces laterales para la formación de nódulos no se alteraría

drásticamente en los mutantes *arf4a*. Por lo tanto, parece poco probable que la arquitectura de la raíz fuera la causa del fenotipo simbiótico. Sorprendentemente, la infección por rizobios, que puede separarse genéticamente de la organogénesis del nódulo (Oldroyd et al., 2011), también se vio gravemente afectada en los mutantes *arf4a*, lo que respalda la función de *MtARF4a* en la simbiosis entre *M. truncatula* y *S. meliloti.* 

#### Los ARFs y su función en la infección por rizobios

La infección por rizobios puede detenerse en la etapa de iniciación o durante la progresión de los eventos de infección hacia las células corticales en división que formarán el primordio de nódulo. Aquí, encontramos que el silenciamiento simultáneo de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b o una mutación en MtARF4a en M. truncatula resultaron en una reducción en la densidad de eventos de infección y una alteración de la progresión de estos eventos hacia el córtex de la raíz. El fenotipo de infección observado utilizando una estrategia de RNAi o el mutante arf4a fue más pronunciado que el observado por Hobecker y colaboradores (2017), ya que la sobreexpresión de miR390 redujo la densidad de eventos de infección, pero no su progresión. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el RNAi es más eficaz para reducir los niveles de transcriptos MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b que la sobreexpresión de miR390. Anteriormente, Breakspear y colaboradores (2014) han demostrado que las mutaciones en MtARF16a también afectaron la infección por rizobios en M. truncatula, principalmente causada por una disminución en la formación de los bolsillos de infección que albergan las microcolonias y el alargamiento de los ITs. Por lo tanto, MtARF16 parece ser necesario para el inicio de la infección más que para la elongación y ramificación de los ITs. Nuestros resultados indican que MtARF4a participa no solo en el inicio sino también en la elongación y ramificación de las ITs, ya que la mayoría de los eventos de infección se detuvieron en la etapa de microcolonia y solo una proporción menor de las ITs alcanzó las células del córtex. Un estudio en L. japonicus usando un reportero DR5:GUS o un sensor de auxina LjDII, que consiste en el dominio DII de A. thaliana IAA28 fusionado a YFP localizado en el núcleo, ha demostrado que las auxinas se acumulan específicamente en los pelos radicales infectados con rizobios y, además, que esta acumulación depende de la señalización por NF (Nadzieja et al., 2018). Además, el mismo estudio reveló que los componentes de la vía de biosíntesis de auxina son regulados de manera positiva específicamente en los pelos radicales infectados con rizobios. En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que los factores de transcripción MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b, podrían mediar en parte la respuesta a auxinas durante la formación y elongación de los eventos de infección por rizobios en *M. truncatula*.

#### ARF y la vía de señalización del factor Nod

En este capítulo de tesis hemos demostrado que la expresión de MtARF2, MtARF3 y MtARF4/b se activó en respuesta a factor Nod, y que esta activación requiere el receptor del factor Nod NFP y el factor de transcripción NF-YA1. Estos datos sugieren que este conjunto de ARFs podría actuar aguas abajo del factor heterotrimérico NF-Y en la vía de señalización del factor Nod. Cabe mencionar que también se reportó que se requiere NFP para la activación de miR160 en M. truncatula, el cual tiene como targets a MtARF10, MtARF16 y MtARF17 (Bustos-Sanmamed et al., 2013). Por lo tanto, la modulación de la expresión de diferentes miembros de la familia ARF parece depender de la vía de señalización de NF en plantas leguminosas. Además, el silenciamiento de MtARF2, MtARF3 y MtARF4/b no afectó la regulación positiva de NF-YA1 y NF-YC1 en respuesta a los rizobios, lo que respalda la idea de que estos miembros de la familia ARF actúan aguas abajo del complejo NF-Y. Por otro lado, hemos encontrado que MtARF2, MtARF3 y MtARF4/b son necesarios para la inducción completa de MtNSP2 en respuesta a S. meliloti, sugiriendo que estos ARF podrían interceptar la vía de señalización de Factor Nod a nivel de MtNSP2 o en algún componente que actúa aguas arriba de dicho gen. Esto concuerda con resultados anteriores que mostraron que las raíces que sobreexpresan miR390, las cuales exhiben niveles reducidos de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b, no aumenta la expresión de *MtNSP1* y *MtNSP2* en *M. truncatula* en respuesta a los rizobios (Hobecker et al., 2017).

En conjunto, estos resultados indican que diferentes miembros de ARF interceptan la vía de señalización de la nodulación actuando como reguladores positivos o negativos de distintos componentes necesarios para la nodulación, tales como el de transcripción de la familia GRAS MtNSP2. Ensayos de ChIP PCR indican que MtNSP2 es target directo de MtARF2 (ver capítulo 2). Curiosamente, estudios recientes en A. thaliana del gen AtARF5 revelaron un nuevo paradigma para explicar la respuesta transcripcional a la auxina mediada por ARFs. Además de la degradación mediada por auxina de las proteínas Aux/IAA que liberan la represión de ARF, los ARF podrían actuar potencialmente como factores de transcripción pioneros al reclutar proteínas remodeladoras de cromatina que promuevan una configuración permisiva de cromatina en los loci regulados por auxina (ej. PLETHORA) permitiendo a elementos proximales cis-AREs volverse accesibles para formar complejos transcripcionales de orden superior y agregar complejidad a la respuesta transcripcional mediada por auxinas (Chandler, 2016; Kornet et al., 2009; Wu et al., 2015). Sin duda, se requiere de una investigación más profunda y a escala global para esclarecer qué loci son blanco de acción de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b, así como los mecanismos por los cuales estos ARFs median la respuesta de auxina en la simbiosis nodular. Los resultados presentados en este capítulo de tesis doctoral apuntan a una función de estos miembros de ARF como reguladores positivos de la nodulación, y su interferencia con la vía de señalización de la nodulación a nivel de *MtNSP2* representa un paso inicial hacia la dilucidación de dichos mecanismos.
## Capítulo 2

"Todos tenemos luz y oscuridad en nuestro interior, lo que importa es qué parte elegimos potenciar"

Harry Potter de J. K. Rowling.

### Resultados

#### Búsqueda de blancos de acción putativos de la vía miR390/TAS3

Con el objetivo de identificar genes de M. truncatula cuya expresión sea regulada directa o indirectamente por la vía miR390/TAS3, durante el desarrollo del trabajo de tesis doctoral de la Dra. Karen Hobecker (2019) se generaron bibliotecas de cDNA para secuenciación masiva (RNAseq) generadas a partir de tejido de raíces que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390) o que fueron transformadas con el vector vacío (EV, empty vector) como control. Las raíces fueron inoculadas con S. meliloti (Sm) o con agua (mock) y a las 48 horas post-inoculación (hpi) se colectó el tejido total de raíz. Se generaron dos réplicas biológicas por condición, se evaluó la calidad y concentración de la bibliotecas de RNA-seq mediante electroforesis capilar en un equipo Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer y se secuenciaron utilizando la tecnología llumina. Los datos fueron analizados previamente por la Dra. Hobecker utilizando los algoritmos del protocolo Tuxedo (Trapnell et al., 2012) y la versión Mt4.0 del genoma de M. truncatula como referencia (Tang et al., 2014), disponible en el portal Phytozome (<u>https://phytozome-</u> next.jgi.doe.gov/) (tesis doctoral Karen Hobecker). Teniendo en cuenta la liberación de la nueva versión Mt5.0 del genoma de M. truncatula generada mediante la tecnología PacBio (Pecrix et al., 2018), la cual provee una mayor cobertura, mejor ensamblado de las lecturas y mejor anotación de genes respecto de la versión Mt4.0, nos propusimos reanalizar los datos de RNAseg generados por la Dra. Hobecker utilizando la nueva versión Mt5.0 del genoma como referencia. La secuenciación utilizando PacBio ha llevado a un ensamblaje del genoma sustancialmente mejorado de M. truncatula Jemalong A17, y ha permitido la identificación de reordenamientos del genoma entre distintos genotipos con una resolución cercana al par de bases (Pecrix et al., 2018). Cabe destacar que el genoma de la versión Mt5.0 también ha permitido un análisis exhaustivo de los elementos transponibles, así como la identificación de nuevos actores involucrados en el desarrollo de nódulos simbióticos, genes no codificantes largos up regulados (IncRNA) en los nódulos o expresados en la zona de diferenciación del nódulo que colocalizan con genes de nodulación dentro de islas simbióticas (Pecrix et al., 2018). A su vez, en este nuevo análisis de los datos de RNA-seq se utilizaron algoritmos más modernos de alineamiento al genoma, ensamblado y cuantificación de lecturas y análisis de expresión diferencial (Figura 29). Para comenzar con el análisis se utilizó el algoritmo HISAT2 (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts 2) (Kim et al., 2019), un programa de alineamiento de lecturas o fragmentos de lecturas rápido y sensible disponible en la plataforma gratuita Galaxy (<u>https://usegalaxy.org/</u>). Para el uso de *HiSAT2* se cargó el nuevo genoma en formato FASTA y los datos obtenidos de las secuenciaciones en formato fastq a la plataforma Galaxy. *HiSAT2* calcula los siguientes parámetros: número de lecturas, cuántas de esas lecturas se alinean una o más veces al genoma de referencia, el porcentaje de alineamiento y, además, genera archivos en formato BAM con los datos de alineamiento que son utilizados posteriormente en el ensamblado y cuantificación de los transcriptos.

En la tabla 2 se presenta el número de lecturas totales para cada biblioteca y los porcentajes de lecturas alineadas a las versiones Mt4.0 y Mt5.0 del genoma de *M. truncatula*. Se obtuvieron en promedio más de 25 millones de lecturas por biblioteca y un porcentaje de alineamiento de más del 90 % con la versión Mt5.0 del genoma comparado con un promedio de 82.06 % cuando se utilizó la versión Mt4.0.

Biblioteca de RNA-	Nº de lecturas	% de lecturas alineadas a	% de lecturas alineadas
seq	totales	MtV5.0 utilizando HISAT2	a MtV4.0 utilizando
			TopHat2.0
EV mock #1	24.340.087	89.67	82.4
EV Sm #1	17.309.434	89.13	80.9
OX390 mock #1	20.630.118	90.25	82.9
OX390 Sm #1	19.731.507	89.90	81.9
EV mock #2	28.610.470	90.04	82.8
EV Sm #2	33.540.946	90.99	83.8
OX390 mock #2	29.173.574	91.25	84.1
OX390 Sm #2	27.849.269	90.08	82.2
Promedio:	25.148.176	90.16	82.6

Tabla 2. Número de lecturas totales RNA-seq y porcentaje de lecturas alineadas al genoma de *M truncatula*.

A partir de los archivos en formato BAM generados y los datos del genoma Mt5.0 en formato *gtf*, se utilizó la herramienta *StringTie* (Pertea et al., 2015), también disponible en la plataforma Galaxy, que permite ensamblado rápido y altamente eficiente de transcriptos a partir de lectura de RNA-Seq. Este programa ensambla y cuantifica transcriptos completos que representan múltiples variantes de empalme (*splicing*) para cada *locus* genómico. En este paso se utilizó la herramienta del programa que permite ensamblar los transcriptos utilizando no sólo los transcriptos presentes en el genoma de referencia, sino también los nuevos transcriptos detectados en cada experimento para poder identificar transcriptos con los transcriptos ensamblados en formato *gtf* y una tabla con los datos de abundancia de los transcriptos en la unidad FPKM (*Fragments per kilobase of transcript per million maped reads*). Una vez obtenidos los archivos de *StringTie* para cada muestra, los mismos se fusionaron mediante la herramienta

StringTie Merge, generando una nueva tabla en formato *gtf* que contienen los transcriptos presentes en el genoma de referencia y los nuevos transcriptos encontrados en las bibliotecas generadas en estas condiciones. Con esta nueva tabla y utilizando nuevamente la herramienta *StringTie* y los archivos en formato BAM generados inicialmente por *HISAT2*, se obtuvieron tablas de "genes counts". Posteriormente se utilizó la herramienta *Deseq2*, que determina la expresión diferencial a partir de tablas de conteo, utilizando comandos en *Rstudio*, reteniendo sólo aquellos genes que presentaron valores de FPKM  $\geq$  1 en al menos una de las bibliotecas analizadas (Figura 29). De los 62300 genes anotados en la versión Mt5.0 del genoma de *M. truncatula*, 31312 genes presentaron valores de FPKM  $\geq$  1 en al menos una de las bibliotecas (Tabla Suplementaria 1).



**Figura 29. Esquema del análisis bioinformático para el análisis de los datos de RNAseq.** El análisis fue realizado mediante los algoritmos HiSAT, StringTie, StringTie Merge, Deseq2 disponibles a través de la plataforma GALAXY (<u>https://usegalaxy.org/</u>). Estos algoritmos fueron utilizados para identificar genes con expresión diferencial entre las muestras de raíz OX390 y EV inoculadas con agua o con *S. meliloti* 1021 a las 48 horas post-inoculación.

Posteriormente, se realizaron comparaciones de a pares entre muestras EV Sm vs EV *mock* y OX390 Sm vs Ox390 *mock*. Mediante el análisis de estas comparaciones de a pares es posible identificar genes cuyos niveles de expresión sean regulados positiva o negativamente a las 48 hpi con *S. meliloti* en las raíces EV y que dicha regulación se vea alterada por la sobreexpresión de miR390. Se consideraron genes de expresión diferencial (GED) aquellos que presentaron un valor de cambio en la expresión (*FoldChange*)  $\ge$  2 y un valor de probabilidad p<0,05 en cada una de las comparaciones. Utilizando estos parámetros se identificaron un total de 1486 GED al comparar las muestras EV Sm vs EV *mock*, 673 regulados positivamente y 813 regulados negativamente (Tablas Suplementarias 2 y 3), mientras que en la comparación de las muestras OX390 Sm vs OX390 *mock* se encontraron 1345 GED, 826 regulados positivamente y 519 genes regulados negativamente por el rizobio (Tablas Suplementarias 4 y 5) (Figura 30).



**Figura 30. Genes con expresión diferencial (GEDs) en comparaciones de a pares.** Se muestra el número GEDs para las comparaciones de a pares: EV *mock* versus EV Sm y OX390 *mock* versus OX390 Sm. Las barras blancas indican el total de genes, las barras azules indican el número de genes con regulación positiva (*Up*) y las barras violeta indican el número de genes con regulación negativa (*Down*) entre Sm vs *mock*.

Con la finalidad de analizar la validez de los datos obtenidos mediante RNA-seq se verificó la inducción de los genes marcadores de la nodulación tales como *MtNF-YA1*, *MtNF-YA2*, *MtERN1*, *MtENOD11*, *MtRIP*, *MtNPL* y *MtNIN*, tanto en las muestras control (EV) como en las muestras OX390 (Tabla Suplementaria 6) (Figura 31). La inducción de estos genes varió entre 2 y 10 veces en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* y los cambios fueron estadísticamente significativos para *MtNIN*, *MtNF-YA2*, *MtENOD11* y *MtNPL* tanto en las raíces EV como en las OX390, mientras que para *MtNF-YA1* y *MtRIP* sólo se encontró significancia estadística en las muestras OX390. Además, *MtNSP2* presentó una mayor inducción en raíces EV con respecto a las raíces OX390, aunque dicho valor no fue estadísticamente significativo. Estos resultados indican que las raíces

de *M. truncatula* utilizadas en el ensayo de RNA-seq sufrieron la reprogramación transcripcional esperada en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.



**Figura 31. Niveles de expresión de genes marcadores de la nodulación.** Se muestran los valores de cambio (*Fold Change*) entre las muestras. Cada valor representa el valor medio de FPKM (*Fragments Per Kilobase Million of fragments*) de muestras EV inoculadas con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas postinoculación sobre el valor medio de FPKM de muestras EV *mock* (barras azules) de dos réplicas biológicas y el valor medio de FPKM de muestras OX390 inoculadas con *S. meliloti* sobre el valor medio de FPKM de muestras OX390 inoculadas con *S. meliloti* sobre el valor medio de FPKM de muestras OX390 inoculadas con *S. meliloti* sobre el valor medio de FPKM de muestras otras biológica. Los asteriscos indican que los valores de las muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras mock con p<0,05 (\*) y p<0,001 (\*\*\*) de acuerdo al análisis realizado con el algoritmo *Deseq2*.

#### Identificación de targets de la vía del miR390/TAS3

Para determinar si el cambio en la expresión génica provocado en las raíces OX390 afecta alguna categoría funcional específica, se realizó una clasificación funcional basada en el GO (por sus siglas en inglés de *Gene Ontology*) seguida de una inspección manual de los GEDs Up y Down regulados en las raíces OX390 inoculadas respecto de las raíces OX390 *mock* y de los GEDs Up y Down regulados en las raíces EV inoculadas con respecto a las raices EV *mock*. Puede observarse que, dentro de los GEDs, las categorías sobrerepresentadas son metabolismo, percepción y señalización, genes con función desconocida y regulación transcripcional (Tablas Suplementarias 2, 3, 4 y 5 y Figura 32).



**Figura 32. Clasificación funcional de los genes regulados diferencialmente en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390.** Clasificación de los genes con expresión diferencial (GEDs) positiva y negativa (*Up* y *Down*, respectivamente) en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* en las raíces EV y OX390. La clasificación en las diferentes categorías funcionales fue realizada en base al análisis del GO (*Gene Ontology*) seguida de una inspección manual. Se grafica el porcentaje del GEDs en cada categoría.

Teniendo en cuenta que muchos factores de transcripción desempeñan funciones fundamentales en los procesos de desarrollo de órganos laterales en plantas, respondiendo a las señales del simbionte y del ambiente para iniciar los programas de organogénesis del nódulo o bien la elongación de las raíces, nos propusimos inspeccionar en detalle la expresión de los

factores de transcripción pertenecientes a diferentes familias en las condiciones en estudio. Se encontraron 139 factores de transcripción con expresión diferencial en alguna de las comparaciones (Tabla Suplementaria 7). A partir de los datos de FoldChange se generó un mapa de calor (heatmap) que permite visualizar los cambios en los valores de FPKM para cada factor de transcripción en ambas condiciones representados por colores (Figura 33). Cada uno de estos factores de transcripción fue organizado por familias. Se encontraron factores de transcripción pertenecientes a las familias WRKY, MYB, NF-Y, GRAS, C2H2 dedos de Zinc (Zinc Finger), bZIP, bHLH y AP2, entre otros. También se identificaron dos genes pertenecientes a la familia LOB, los MtrunA17Chr1q0184271 MtrunA17Chr5q0402611. genes V La expresión de MtrunA17Chr1q0184271 resultó interesante ya que los niveles de acumulación de transcriptos de este gen aumentaron significativamente en las raíces EV, pero disminuidos en las raíces OX390 en respuesta a la inoculación con el rizobio.



Figura 33. *Heatmap* representado los cambios en los niveles de transcritos correspondientes a factores de transcripción expresados diferencialmente (GEDs) en respuesta a *S. meliloti* en las muestras EV y/o **OX390.** Se muestra un gráfico de *heatmap* representando los cambios (*Fold Change*, FC) en los valores de FPKM para los factores de transcripción obtenidos de las comparaciones *mock* vs Sm, en las muestras EV y OX390. La escala de colores representa el log<sub>2</sub> *del Fold Change* entre – 4 (azul) y + 4 (violeta). El transcripto *MtrunA17Chr1g0184271* se encuentra indicado con una flecha violeta.

Durante el trabajo de tesis doctoral de la Dra. Karen Hobecker (2019) se evaluó el nivel de expresión del transcripto *MtrunA17Chr1g0184271* mediante RT-qPCR en una réplica biológica independiente a las usadas para construir las bibliotecas. Las raíces control EV mostraron una inducción de aproximadamente ocho veces de este transcripto a las 48 hpi con *S. meliloti,* mientras que dicha inducción no se observó en las raíces OX390 (Figura 34 A). Para evaluar si la inducción de *MtrunA17Chr1g0184271* podría encontrarse modulada por los factores de transcripción de la familia ARF, en este trabajo de tesis doctoral verificamos que los niveles del transcripto *MtrunA17Chr1g0184271* tampoco aumentan significativamente en respuesta al rizobio en las raíces silenciadas en los genes *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b*. Asimismo se verificó la inducción de *MtrunA17Chr1g0184271* en las raíces de plantas WT, pero no en las raíces de las plantas mutantes *arf4a* (Figura 34 B). Estos datos sugieren que el gen *MtrunA17Chr1g0184271* sería regulado por la vía miR390/*TAS3/ARFs* y nos llevaron a hipotetizar que dicho gen podría ser un *target* directo o indirecto de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b.



**Figura 34. Niveles de expresión de** *MtrunA17Chr1g0184271*. Los niveles de expresión de *MtrunA17Chr1g0184271* fueron cuantificados en las raíces transformadas con A. el vector vacío (EV) o en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390). Datos obtenidos de Hobecker et al (2019) y B. en las raíces *ARF2/3/4* RNAi y *GUS* RNAi (panel zquierdo) y en las raíces *arfa4* y WT (panel derecho) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media ± el error estándar. Los niveles de los transcriptos fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV, *GUS* RNAi o WT *mock*. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) y p<0,001 (\*\*\*).

En base a estos resultados y atendiendo a que diferentes miembros de la familia LBD han sido involucrados en el desarrollo de nódulos y/o de raíces laterales (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019), en el presente trabajo de tesis doctoral nos propusimos caracterizar los miembros de la familia LBD en *M. truncatula*. En particular, se profundizó el análisis filogenético y de expresión (este capítulo) y la caracterización funcional (ver capítulo 3) del gen *MtrunA17Chr1g0184271*  durante la nodulación y el desarrollo de raíces. Además, teniendo en cuenta que ciertos miembros de la familia ARF regulan directamente la expresión de genes de la familia LBD, nos propusimos estudiar si *MtrunA17Chr1g0184271* es un *target* directo de MtARF2.

### Construcción de alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos de la familia LBD

Para evaluar el número y las relaciones filogenéticas de los distintos miembros de la familia LBD que nos permitan inferir aspectos evolutivos acerca de esta familia en la especie M. truncatula, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia LBD de M. truncatula y A. thaliana. Primero, se descargaron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los 42 miembros de la familia LBD de A. thaliana reportados previamente (Shuai et al., 2002), ingresando con el identificador de cada gen a la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR, https://www.arabidopsis.org/). Estas secuencias de A. thaliana se utilizaron como secuencias de consulta ("querie") para la búsqueda de las secuencias correspondientes a las familias LBD de *M. truncatula* utilizando el algoritmo *blastp* y la base de datos MtrunA17r5.0-ARN disponible en https://medicago.toulouse.inra.fr (Pecrix et al., 2018). Esta búsqueda de secuencias permitió identificar 62 miembros de la familia LBD en M. truncatula. Se generaron alineamientos de secuencia de aminoácidos incluyendo todas las proteínas LBD de M. truncatula y A. thaliana. A partir de dichos alineamientos múltiples se construyó un árbol filogenético (Figura 35) y utilizando la clasificación descripta previamente en A. thaliana (Zhang et al., 2020) se asignaron las diferentes clases dentro de la familia LBD de *M. truncatula*. De manera similar a lo observado previamente en otras especies (Zhang et al., 2020), los miembros de la familia LBD de *M. truncatula* se dividieron en dos grandes clases: Clase I y Clase II, dentro de las cuales pueden identificarse diferentes subclases. Dentro de la Clase I se identificaron nueve subclases, las clases IA1, IA2a, IA2b, IA2c, IB, IC1, IC2, IEa e IEb, mientras que en la Clase II se identificaron sólo dos subclases, las Clases IIA y IIB. Las proteínas codificadas por los genes se ubicó dentro del Clado IB, el cual contiene los miembros AtLBD16, AtLBD17, AtLBD29 y AtLBD33 de A. thaliana, entre otros.



**Figura 35. Árbol filogenético de las proteínas LBD de** *M. truncatula* **y** *A. thaliana*. El árbol fue generado en base a un alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos de las proteínas LBD aplicando el método de *neighbor-joining* y un *bootstrap* de 1000 iteraciones a través del programa MegaX. Las líneas de colores indican la clasificación de las diferentes subclases en base a lo reportado previamente por Zhang y colaboradores (2020). Las flechas violetas indican la posición de los genes *MtrunA17\_Chr7g0261031* y *MtrunA17\_Chr1g0184271* dentro de la clase IB.

A partir del árbol filogenético, observamos que los miembros de *M. truncatula* codificados por los genes *MtrunA17\_Chr7g0261031* y *MtrunA17\_Chr1g0184271*, se agruparon dentro del mismo clado que los miembros AtLBD17 y AtLBD29 de *A. thaliana* (Figura 35). Para investigar cuál de estos dos miembros de *M. truncatula* correspondía al mejor homólogo de AtLBD17 y cuál al al de AtLBD29 de *A. thaliana* se realizaron alineamientos de a pares entre las secuencias de dichas proteínas utilizando el algoritmo *blastp* disponible a través del portal NCBI y se determinó el porcentaje de identidad, el valor de *score* total y el valor de E. Los datos de *total score*, valor de E y % de identidad entre AtLBD17 y AtLBD29 y las proteínas codificadas por *MtrunA17\_Chr1g0184271* y *MtrunA17\_Ch7g0261031* de *M. truncatula* se presentan en la Tabla 3. La proteína codificada por el gen *MtrunA17\_Ch7g0261031* presentó un porcentaje de identidad, y un valor del *score* total mayor y un valor de E menor con AtLBD17 respecto de la comparación con AtLBD29. Por otra parte, para la proteína codificada por el gen *MtrunA17\_Chr1g0184271*, el porcentaje de identidad fue mayor AtLBD17, sin embargo, el valor del *score* total resultó mayor y el valor de E menor en la comparación AtLBD29.

**Tabla 3.** Total score, valor de E, *score* total y % de identidad entre AtLBD17 y AtLBD29 de *A. thaliana* y MtrunA17\_Chr1g0184271 y MtrunA17\_Ch7g0261031 de *M. truncatula*.

	AT2G42440.1 (AtLBD17)	AT3G58190.1 (AtLBD29)
MtrunA17_Chr1g0184271	Valor de E*: 1e-66	Valor de E: 1e-71
	Total score**: 193	Total score: 205
	% de Identidad***: 70.99 %	% de Identidad: 50.00 %
MtrunA17_Chr7g0261031	Valor de E: 6e-73	Valor de E: 2e-77
	Total score: 209	Total score: 220
	% de Identidad: 73.28 %	% de Identidad: 79.67 %

\* Valor de E (probabilidad de encontrar un alineamiento con ese score por azar en la base de datos utilizada, siendo los valores cercanos a cero una mayor probabilidad de identidad entre las secuencias)

\*\*Total score (cantidad de aminoácidos comunes en cada posición)

\*\*\*% de identidad (cantidad de aminoácidos que son iguales entre las secuencias)

A partir del análisis de porcentaje de identidad, score total y valor de E no pudimos obtener resultados concluyentes acerca del mejor homólogo de los genes analizados. Para determinar si el gen *MtrunA17\_Chr1g0184271* posee un origen evolutivo común con los genes *AtLBD17* y/o *AtLBD29* de *A. thaliana*, se realizó un análisis de sintenia utilizando el sitio https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\_v3\_dicots/synteny/index (Figura 36) y los identificadores de gen de la versión Mt4.0 del genoma de *M. truncatula*, la cual se encuentra disponible en dicha base de datos.



**Figura 36. Sintenia del gen MtrunA17Chr1g0184271 utilizando el portal de Plaza**. Sintenia entre el gen *MtrunA17Chr1g0184271 (Medtr1g070205)* y *AtLBD17* (A) y *AtLBD29* (B). Los diferentes genes se indican con flechas y aquellos que pertenecen a la misma familia se encuentran en el mismo color. En (A) y (B) se observa que el gen *Medtr1g070205* tiene un solo gen en común unido por una línea.

Este análisis permitió observar que el gen *MtrunA17\_Chr1g0184271* (*Medtr1g070205* de la versión Mt4.0) comparte sólo un gen flanqueante en común tanto con *AtLBD17* como con *AtLBD29*, por lo que no pudimos concluir si dicho gen de *M. truncatula* es el sinténico de los genes *AtLBD17* o de *AtLBD29* de *A. thaliana*. En base a estos análisis decidimos nombrar al gen *MtrunA17\_Chr1g0184271* como *MtLBD17/29a*, mientras que al gen *MtrunA17\_Ch7g0261031* lo nombramos *MtLBD17/29b*.

### Análisis de las regiones abiertas de la cromatina y de sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen *MtLBD17/29a* en raíces de *M. truncatula*

Para comenzar el análisis de la actividad del promotor del gen *MtLBD17/29a* se consultaron datos de regiones abiertas de la cromatina que se encuentran río arriba y en el cuerpo del gen. Para ello se utilizaron los datos de ATAC-seq (*assay for transposase accessible chromatin*) de tejido de punta de raíz de *M. truncatula* reportados por Reynoso y colaboradores (2019). La técnica de ATAC permite identificar regiones de la cromatina de conformación abierta asumiendo que dichas regiones son más susceptibles de incorporar transposones que llevan secuencias adaptadoras. Estas regiones en las cuales se insertó el transposón se visualizan como

pico de mayor densidad de lecturas luego del alineamiento de las lecturas al genoma de referencia. En la Figura 37 se presentan los picos de ATAC correspondientes a 24 kilobases (kb) que río arriba gen *MtLBD17/29a*. A partir de estos datos se identificaron dos picos de cromatina abierta próximos al sitio de inicio de la transcripción (SIT) de *MtLBD17/29a*, dentro de los 2 kb río arriba del SIT, y siete picos distales que se encuentran a más de 15 kb del SIT (Figura 37 A). Se definió una longitud de la región promotora del gen *MtLBD17/29a* en aproximadamente 2 kb, la cual incluye las regiones proximales al SIT, para analizar los sitios posibles de uniones de factores de transcripción. En la secuencia de dicha región promotora se identificaron sitios de unión a factores de transcripción de la familia NF-Y (CCAAT), los cuales desempeñan funciones esenciales en la nodulación, sitios de unión del factor de transcripción NIN (AAGCT o AAGAT), el cual puede actuar como regulador positivo o negativo de la nodulación dependiendo del tejido. Por último, se encontraron sitios de unión ARE para los factores de transcripción de tipo ARFs (TGTCTC) en la región de aproximadamente a 1 kb y 1,3 kb río arriba del SIT del gen *MtLBD17/29a* (Figura 37 B).



**Figura 37.** A. Picos correspondientes a regiones abiertas de la cromatina correspondientes al locus *MtLBD17/29a*. En azul se presentan los picos de ATAC de las lecturas obtenidos por Reynoso *et al.*, 2019. Las cajas azules debajo de los picos indican los modelos génicos de los genes en dicha región del genoma, donde las cajas altas corresponden a las regiones codificantes. Las puntas de flechas blancas indican la dirección de la transcripción. Las líneas verdes y rojas indican los picos proximales y distales respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT). B. Secuencias correspondientes a elementos *cis* reconocidos por factores de transcripción asociados a la nodulación en la región promotora del gen *MtLBD17/29a*. Las cajas negras indican exones, mientras que las líneas indican intrones en el gen *LBD17/29a*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (SIT). Las cajas magenta muestran la secuencia de los sitios de unión del factor de transcripción NIN y las cajas turquesas indican la secuencia de los sitios de unión para los factores de transcripción ARF.

#### Ensayo de Chip PCR para evaluar la unión de MtARF2 al promotor de MtLBD17/29a

Teniendo en cuenta que los niveles del transcripto *MtLBD17/29a* no se inducen en respuesta al rizobio en las raíces silenciadas en los genes *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b*, nos propusimos estudiar si los ARFs regulan las expresión de *MtLBD17/29*a. Para ello se realizaron fusiones traduccionales del factor de transcripción MtARF2 al epitope His-FLAG (HF) (HF-ARF2) utilizando un vector que permite la fusión del ORF bajo el control del promotor CaMV35S, el cual es un promotor fuerte y cuasi-constitutivo, para luego realizar la técnica de inmunopurificación de cromatina seguida de PCR (ChIP-PCR). La técnica de ChIP permite co-inmunoprecipitar regiones de la cromatina que se encuentran asociados al factor de transcripción mediante el uso del anticuerpo anti-FLAG unido la proteína G conjugada a bolillas magnéticas.

Inicialmente se verificó la expresión del transgén *HF-MtARF2* en plantas HF-ARF2 mediante RT-PCR utilizando *primers* de ARF2 y de la octopina sintasa, presente en la región 3´no traducida del transcripto (Figuras 38 A y 38 B). También se verificó mediante RT-qPCR el aumento de los niveles del transcripto *MtARF2*, los cuales representan la suma de los niveles del transcriptos del gen endógeno y del transgén *HF-MtFLAG*, en las raíces HF-ARF2 respecto de las EV (Figura 38 C). Luego se analizó el fenotipo asociado a la expresión ectópica y constitutiva de *HF-MtARF2*. No se observaron diferencias en las cinéticas de nodulación, ni en los eventos de infección en las plantas HF-ARF2 en comparación con las plantas transformadas con el vector vacío (Figuras 38 D y 38 E).



Figura 38. A. Esquema de la construcción HF-ARF2 que expresa el ORF de ARF2.P35S representa el promotor CaMV35S, *nptll* es el gen de la neomicina fosfotransferasa,  $\hat{\Omega}$  es el omega *leader* que funciona como enhancer traduccional, ARF2 es el ORF del gen MtARF2 y OCS3 es el 3´UTR del gen Octopina sintasa. Las flechas azules indican los primers utilizados para corroborar específicamente la expresión del transgén, las flechas negras indican los primers utilizados en el ensayo de RT-qPCR que cuantifica los transcriptos provenientes del gen endógeno y del transgén. B. La expresión del transgén HF-ARF2 se determinó mediante RT-PCR usando cDNA de raíces HF-ARF2 y primers de Octopina sintasa (OCS 3') presentes en el vector utilizado y el primer F del gen MtARF2 Se realizaron 35 ciclos de PCR. C. Niveles del transcripto MtARF2 y HF-MtARF2 en raíces de plantas HF-ARF2 y HF-EV. Los niveles de transcriptos se cuantificaron mediante RT-qPCR usando primers específicos para MtARF2 en raíces inoculadas con S. meliloti a las 48 horas post inoculación (ver Anexo 1). Los valores obtenidos se normalizaron por los valores del transcripto HIS3L Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,001 (\*\*\*) en un test t-Student no apareado de dos colas entre las muestras HF-ARF2 y EV.D. Número de nódulos formados en raíces de M. truncatula control EV y HF-ARF2 fueron cuantificado a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi con S. meliloti. E. Cuantificación de hilos de infección (ITs). Se muestra los ITs por centímetro de raíz en raíces HF-ARF2 en comparación con las raíces EV.

Para realizar el ensayo de ChIP-PCR se colecto el tejido de raíz de plantas compuestas HF-ARF2 de *M. truncatula* luego de 48 hpi con *S. meliloti*. El tejido fue fijado mediante infiltración al vacío en presencia de formaldehído y luego pulverizado en nitrógeno líquido. Posteriormente, se procedió al aislamiento de los núcleos y la fragmentación de la cromatina mediante sonicación. A partir de la cromatina fragmentada (*Input*) se llevó a cabo la inmunopurificación de HF-MtARF2 utilizando anticuerpo anti-FLAG o anti-IgG como control unido a bolillas magnéticas conjugadas a proteína G. Finalmente, se purificaron los fragmentos de DNA, los cuales fueron utilizados en reacciones de qPCR (Figura 39 B). Para ello, se analizaron las secuencias promotoras de *MtLBD17/29a*, *MtARF2*, *MtARF3*, *MtARF4a*, *MtARF4b* y *MtNSP2*. Se identificó un elemento de unión a ARF o de respuesta a auxinas (ARE: *auxin response element*) en las regiones 2 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *MtARF3*, *MtARF4a* y *MtARF4b* y dos AREs en las regiones 2 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de la transcripción de la transcripción de los genes *MtARF3*, *MtARF4a* y *MtARF4b* y dos AREs en las regiones 2 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *MtNSP2* y *MtLBD17/29a*. No se encontró ningún ARE en la región promotora de *MtARF2*. A partir de este análisis se diseñaron *primers* flanqueando los sitios de ARE presentes en los promotores de *MtARF3*, *MtARF4a*, *MtARF4b*, *MtNSP2* y *MtLBD17/29a* (Figura 39 A) para ser utilizados en los ensayos de qPCR.



**Figura 39.** A. Elementos de respuesta a auxina (ARE) en los promotores de los genes *MtARF3, MtARF4a, MtARF4b, MtNSP2* y *MtLBD17/29a* y *primers* diseñados para identificar los posibles *targets* de MtARF2. Se esquematizan 2 Kb de la región promotora de los posibles *targets* de MtARF2, así como los elementos ARE presentes en cada promotor (cajitas). Las flechas negras enfrentadas indican la posición de los *primers* diseñados para determinar el enriquecimiento de estas regiones en las muestras de ChIP mediante PCR cuantitativa (qPCR), las flechas negras indican el sitio de inicio de la transcripción. B. Se realizó un ensayo de ChIP utilizando anticuerpos antiFLAG o antilGgs sobre tejido de raíces que expresan *HF-MtARF2*. Las regiones de interés fueron cuantificadas en el Input y las muestras de ChIP mediante qPCR. El enriquecimiento fue expresado en % en las muestras de ChIP/Input y relativizado por el enriquecimiento en las muestras inmunoprecipitadas con IgGs/Input. Como control negativo se utilizaron *primers* correspondientes a un fragmento del gen *ACTINA11 (ACT)* que no posee elementos ARE. Las barras representan la media y SEM de dos réplicas técnicas.

Los resultados del ChIP-qPCR de HF-ARF2 mostraron que la región ARE1 del gen *MtLBD17/29a* presenta un enriquecimiento en las muestras de ChIP inmunoprecipitadas con anti-FLAG de más de 14 veces con respecto a las muestras inmunoprecipitadas con anti-IgGs, lo que sugiere que MtARF2 se uniría directamente a esta región del promotor de *MtLBD17/29a*. Además, la regiones ARE2 de *MtNSP2* y el único elemento ARE presente en el promotor de *MtARF4a* 

también evidenciaron un enriquecimiento de aproximadamente 2 veces en las muestras de ChIP inmunoprecipitadas con antiFLAG respecto de aquellas inmunoprecipitadas con anti-IgGs. Sin embargo, la región promotora del gen *MtARF3 o MtARF4b* no mostraron un enriquecimiento en las muestras inmunoprecipitadas con anti-FLAG respecto de las inmunoprecipitadas con anti-IgGs (Figura 39 B). En conjunto, estos resultados sugieren que *MtLBD17/29a, MtARF4a* y *MtNSP2* son blancos directos del factor de transcripción MtARF2.

## Caracterización de la expresión de *MtLBD17/29a* en *M. truncatula* en diferentes tejidos, estadios de desarrollo de raíces laterales y durante la simbiosis fijadora de nitrógeno

Utilizando el identificador del transcripto de *MtBD17/29a* correspondiente a la versión Mt5.0 del genoma de *M. truncatula* se obtuvieron datos de expresión de la base de datos *Medicago Gene Expression Atlas*, disponible públicamente a través del portal https://mtgea.noble.org/v3/. Dicha base de datos contiene información de la expresión de transcriptos a escala masiva obtenidos a partir de microarreglos de DNA de distintos tejidos de la planta (Benedito et al., 2008) y datos de expresión obtenidos mediante RNA-seq de raíces inoculadas y no inoculadas con *S. meliloti*, nódulos y zonas de nódulos (Roux et al., 2014; Schiessl et al., 2019).

A partir del análisis de los datos de Benedito (2008) se pudo observar que los transcriptos correspondientes al gen *MtLBD17/29a* se acumulan a niveles similares en hojas, tallo, flor y vainas, mientras que presentan una acumulación significativamente mayor en raíces y nódulos jóvenes de 4 dpi en comparación con los tejidos de la parte aérea. Sin embargo, estos niveles fueron menores en nódulos de 10 dpi y se mantuvieron bajos en nódulos maduros (14 y 28 dpi) respecto de las raíces no inoculadas o respecto de nódulos de 4 dpi (Figura 40).



Figura 40. Datos de expresión de *MtLBD17/29a* en distintos tejidos de *M. truncatula* obtenidos mediante microarreglos de DNA por Benedito y colaboradores (2008). Los datos se presentan en RMA (*Robust Multichip Average*) obtenidos a partir del análisis de microarreglos de DNA. Las barras representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error el desvío estándar (SD) de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas en un t-test no apareado con p<0,01(\*\*).

Analizando los datos de RNA-seq de raíces, nódulos de 15 dpi y diferentes zonas de nódulo obtenidas mediante microdisección láser (Roux et al., 2014) se pudo concluir que los transcriptos *MtLBD17/29a* resultaron significativamente menores en nódulos de 15 dpi respecto de las raíces no inoculadas (Figura 41 A) y que en dichos nódulos la acumulación de transcriptos se vio restringida a la zona meristemática o zona I (Figura 41 B).



**Figura 41. Datos de expresión de** *MtLBD17/29a* en raíz, nódulos y distintas zonas del nódulo. Expresión del gen *MtLBD17/29a* en A. Raíz y nódulo de 15 dpi con *S. meliloti* y en B. Zonas del nódulo reportados por Roux y colaboradores (2014). La Zona I corresponde a la región meristemática, la Zona IId es la zona de infección distal, la Zona IIp es la zona de infección proximal, IZ es la interzona y Zona III es la zona de fijación. Los datos se presentan en FPKM (*Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments*) obtenidos a partir del análisis de RNA-seq. Las barras representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error el desvío estándar (SD) de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas en un *test t*-Student no apareado con p<0,01 (\*\*).

Además, se obtuvieron los datos de acumulación de transcriptos de miembros del Clado IB de la familia LBD en diferentes estadios luego de la inoculación puntual (spot-inoculation) con S. meliloti (0 a 196 hpi) y luego de la inducción de la formación de las raíces laterales a partir de los datos de RNA-seq reportados por Schiessl y colaboradores (2019). En este reporte, la expresión de genes se determinó en el tejido de raíces colectado específicamente alrededor de las regiones que fueron inoculadas puntualmente con S. meliloti. A su vez, la formación de raíces laterales se analizó colectando el tejido de las raíces luego de girarlas a un ángulo de 135 grados, lo cual induce su formación (Schiessl et al., 2019). Se pudo observar que los niveles de MtLBD17/29a fueron significativamente mayores en raíces de M. truncatula Jemalong A17 a los 14 y 24 hpi con S. meliloti con respecto a las raíces mock. A tiempos tardíos de infección por rizobio, entre los 3 y 7 dpi, la expresión de *MtLBD17/29a* se vio reprimida. Otros miembros del Clado IB de la familia LBD, incluidos MtLBD16, MtLBD17/29b y MtLBD33, también fueron regulados a diferentes tiempos después de la inoculación con el rizobio (Figura 42 A). Por otra parte, se observó una mayor acumulación de los transcriptos MtLBD16, MtLBD17/29a y MtLBD17/29b a las 24 hpi en las raíces de la variedad de M. truncatula R108, la cual ha sido utilizada para generar mutantes insercionales. Sin embargo, no se detectó su mayor acumulación de los transcriptos MtLBD17/29a y MtLBD17/29b en las raíces de plantas nin y cre1, sugiriendo que el factor de transcripción MtNIN y el receptor de citoquininas MtCRE1 podrían ser requeridos para la inducción de los genes MtLBD17/29a y MtLBD17/29b en etapas tempranas de la simbiosis (Figura 42 B).

En paralelo, se analizó la expresión de estos genes LBD de *M. truncatula* durante la formación de raíces laterales utilizando los datos de RNA-seq reportados por Schiessl et al (2019). A las 24 horas post inducción de la formación de las raíces laterales se puede observar la iniciación del primordio de las raíces laterales, a las 48 horas se observa la emergencia de la raíz lateral y a las 72 horas ya se observa su elongación con un meristema establecido (Schiessl et al., 2019). Se observó un aumento de los niveles de transcripto de *MtLBD17/29a* a las 24, 48 y 60 horas luego de inducida la formación de raíces laterales, respecto de aquellas raíces que no fueron inducidas. A tiempos más avanzados de la inducción de las raíces laterales, 72 horas post inducción, la expresión de *MtLBD17/29a* disminuye (Figura 42 C). Estos datos sugieren que *MtLBD17/29a* podría ser reprimido durante las etapas de desarrollo de los primordios de raíces laterales, y la emergencia y elongación de las mismas. Además, tal como habían reportado Schiessl y colaboradores (2019), los niveles de expresión de otros miembros del clado IB, *MtLBD17/29b* y *MtLBD16*, disminuyen a las 24 y 72 horas post inducción de raíces laterales, respectivamente.



**Figura 42. Datos de expresión de** *MtLBD16, MtLBD17/29a, MtLBD17/29b y MtLBD33.* A. Expresión a diferentes tiempos luego de la inoculación con *S. meliloti* o con agua (*mock*) B. Expresión en plantas WT R108 y mutantes *nin y cre1* a las 12 y 24 hpi con *S. meliloti* o con agua (*mock*) C. Expresión a diferentes tiempos luego de la inducción de las raíces laterales. Los datos fueron obtenidos a partir de los datos de secuenciación masiva reportados por Schiessl *et al.,* 2019 y se presentan como el log2 *Fold Change* de los FPKM respecto del tiempo 0. El color gris indica que no se registró expresión en esa condición. Los asteriscos indican diferencias significativas en un *test t-*Student de dos colas no apareado con p<0.05 (\*).

### Análisis de la expresión de *MtLBD17/29a* en respuesta al Factor Nod y su dependencia con la vía de señalización del Factor Nod

Como se mencionó anteriormente, la expresión de *MtLBD17/29a* aumenta durante la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti*. Teniendo en cuenta que la expresión de los genes *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a* y *MtARF4b,* es dependiente de la percepción de NFs y que *MtLBD17/29a* es un blanco de acción directo de MtARF2, nos propusimos investigar si la expresión de *MtLBD17/29a* también dependía de la señalización del NF. El análisis de RT-qPCR sobre raíces de plantas WT tratadas con NFs purificados de *S. meliloti* durante 48 horas reveló que los niveles del mRNA *MtLBD17/29a* aumentaron más de 5 veces en respuesta a los NFs en comparación con las raíces *mock* (inoculadas con agua), sugiriendo que *MtLBD17/29a* sería regulado positivamente por los NFs de *S. meliloti* (Figura 43). Posteriormente, se evaluó si la inducción de *MtLBD17/29a* era dependiente de genes que forman parte de la vía de señalización del NF. Para ello, se determinaron los niveles de *MtLBD17/29a* en respuesta a las inoculación con el rizobio no se vio afectada en los mutantes *nf-ya1, nfp, y ern-1*, mostrando una

expresión que no fue significativamente diferente a la observada en plantas WT. Sin embargo, se detectaron niveles significativamente menores en las raíces de plantas mutantes *nfp* no tratada con NF respecto de las WT en las mismas condiciones, sugiriendo que el gen que codifica el receptor NFP podría ser requerido para mantener los niveles basales de *MtLBD17/29a* en las raíces de *M. truncatula*. En las plantas mutantes *skl* se observó inducción, pero la misma fue mucho menor y significativamente diferente a la observada en las plantas WT de *MtLBD17/29a*, sugiriendo que la señalización por etileno podría desempeñar alguna función en la regulación de *MtLBD17/29a*. Resultó interesante observar que la inducción de *MtLBD17/29a* en respuesta al rizobio se vio severamente comprometida en las plantas mutantes *nin*. Estos resultados son coherentes con los datos de RNA seq ilustrados en la Figura 42 donde no se verificó un aumento de los niveles de *MtLBD17/29a* en respuesta al *S. meliloti* en las mutantes *nin*. En su conjunto, los datos de expresión sugieren que la inducción de *MtLBD17/29a* en etapas tempranas de la simbiosis requeriría de la función del factor de transcripción NIN (Figura 43).



**Figura 43.** *MtLBD17/29a* es inducido por los NFs de *S. meliloti* y depende de *NIN*. Los niveles del transcripto *LBD17/29a* se analizaron en tejido de raíz de plantas WT y plantas mutantes *nfp*, *nf-ya1*, *ern1*, *skl* y *nin* tratadas con factores Nod purificados  $10^{-8}$  M (NFs, barras violetas) o mock (control, barras blancas) durante 48 h. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR y se normalizaron a los niveles del transcrito *HIS3L*. Los valores se expresan en relación con la muestra WT *mock*, que se estableció en 1. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en un *test t*-Student de dos colas no apareada con un valor de p<0,05.

### Análisis de la expresión espacial y temporal del gen *MtLBD17/29a* en raíces de *M. truncatula*

Con el objetivo de analizar la expresión espacial y temporal del promotor del gen *MtLBD17/29a* se generaron fusiones transcripcionales de un fragmento de 1460 pb del promotor *MtLBD17/29a* a los genes reporteros *GUS* y *GFP* utilizando el vector binario pKGWFS7,0 (Karimi

et al., 2007) obteniéndose la construcción denominada pLBD17/29a. Esta construcción fue introducida en A. rhizogenes Arqua1 y utilizada para generar plantas compuestas de M. truncatula. La inspección por microscopia de fluorescencia de las raíces transgénicas permitió evaluar la expresión de GFP en distintos estadios de interacción simbiótica luego de la inoculación con una cepa de S. meliloti que expresa la proteína fluorescente RFP. No se detectó expresión de GFP en etapas tempranas de la interacción en los pelos radicales que contenían hilos de infección a los 6 dpi, pero si se detectó emisión de fluorescencia de GFP en las células de la raíz que se encuentran por debajo del pelo radical infectado (Figura 44). En etapas más tardías de desarrollo del nódulo, es decir en nódulos inmaduros de 10 dpi y maduros de 21 dpi, se observó actividad del promotor de MtLBD17/29a (detectada por la emisión de fluorescencia de la GFP) en las células no infectadas del nódulo que rodean a las células infectadas (detectadas por la emisión de fluorescencia de la RFP) para ambos estadios (Figura 44). Esta expresión es reminiscente de lo observado previamente para los componentes de la vía miR390/TAS3/ARFs, en particular los promotores de MtMIR390, MtTAS3 y MtARF4a, los cuales exhiben un patrón de expresión similar en nódulos de 10 y 21 dpi (Hobecker et al., 2017; Kirolinko et al., 2021), sustentando la hipótesis de que MtLBD17/29a sería un target de la vía miR390/TAS3/ARFs.



**Figura 44.** Análisis del patrón de expresión espacio temporal de *MtLBD17/29a* en diferentes estadios de interacción simbiótica. Expresión del gen reportero *GFP* en nódulos de plantas compuestas *pLBD17/29a*:*gus-gfp* a los 6, 10 y 21 dpi con una cepa de *S. meliloti* que expresa RFP. Las líneas punteadas marcan la raíz y la célula epidérmica del nódulo. Barras de escala: 50 μm.

La evaluación de la fluorescencia de GFP y tinción histoquímica de las raíces *pLBD17/29a* no inoculadas demostró que el promotor *MtLBD17/29a* es activo en la zona meristemática apical de las raíces principales y laterales. También se observó actividad del promotor de *MtLBD17/29a* en el tejido vascular de las raíces principales y en los primordios de las raíces laterales (Figura 45). Estos resultados sugieren que *MtLBD17/29a* podría desempeñar funciones en la iniciación de las raíces laterales, y en la elongación de las raíces principales y laterales.

### pLBD17/29a



**Figura 45. Análisis de expresión específico de tejido de LBD17/29a en raíces.** Expresión del gen reportero *GFP* (A) y *GUS* (B) en raíces de plantas *pLBD17/29a.* PR: raíz principal, RL: raíz lateral, ELR: raíz lateral emergida y PRL: primordio de raíz lateral. Barras de escala: 100 µm

### Discusión

En el presente capítulo de tesis se llevó a cabo un nuevo análisis in silico de los cambios en el transcriptoma desencadenados por la activación de la vía miR390/TAS3 para identificar posibles targets del módulo miR390/TAS3/ARFs. Para ello se compararon los transcriptomas de plantas que sobrexpresaban al miR390 (OX390) con el de plantas control (EV) inoculadas o no con el rizobio y se utilizó como genoma de referencia el nuevo genoma de M. truncatula Mt5.0 publicado por Pecrix y colaboradores (2018). Los alineamientos al nuevo genoma arrojaron un mayor porcentaje de lecturas alineadas al nuevo genoma Mt5.0 superior al 90 %, comparado con sólo un porcentaje promedio del 82 % cuando las lecturas fueron alienadas a la versión del genoma Mt4.0. Este mayor porcentaje de lecturas mapeadas se debe muy probablemente a una mayor cobertura y mejor ensamblado de las lecturas de la versión Mt5.0 obtenidas por PacBio. A partir de este análisis se identificaron miles de genes que presentaban una expresión diferencial en las muestras EV mock vs EV Sm o en las OX390 mock vs OX390 Sm, incluyendo 143 genes que codifican factores de transcripción correspondientes a distintas familias, muchas de las cuales han sido implicadas en la nodulación (AP2, GRAS, NF-Y, etc)(Kaló et al., 2005; Vernié et al., 2008; Zanetti et al., 2010). Este grupo incluyó transcriptos que aumentan su abundancia en respuesta al rizobio en raíces EV, pero cuya expresión disminuía o no se veía alterada en las plantas OX390 en respuesta al rizobio. Entre ellos, se identificó el gen MtLBD17/29a que codifica un miembro de la Clase IB de la familia de transcripción LBD, clase que ha sido previamente implicada en el desarrollo de órganos laterales como las raíces laterales y los brotes (Lee et al., 2017,Lee et al., 2009; Okushima et al., 2007; Omary et al., 2022; Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019).

La inducción de *MtLBD27/29a* en respuesta al rizobio se vio afectada cuando se activó el módulo miR390/*TAS3* mediante la sobreexpresión del miR390, también se vio afectada en plantas silenciadas en los transcriptos *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b* (*ARF2/3/4a/b* RNAi) o bien en plantas mutantes *arf4a* comparadas con las plantas control (*GUS* RNAi o WT, respectivamente). Por otra parte, la inactivación de la vía miR390/*TAS3* mediante una mutación en *AGO7* aumentó la inducción de *MtLBD17/29a* en respuesta a los rizobios (tesis doctoral de Karen Hobecker). Estos resultados sugieren que la activación de *MtLBD17/29a* durante la simbiosis es dependiente de la vía miR390/*TAS3/ARFs*, particularmente de la activación de *MtARF2, MtARF3* o *MtARF4a/b*. Encontramos que el promotor de *MtLBD17/29a* posee dos sitios ARE de unión a ARFs. Los ensayos de ChIP-PCR utilizando plantas que expresan HF-MtARF2 mostraron que el sitio ARE1 presente en el promotor del gen *MtLBD17/29a* es capaz de unir directamente a HF-MtARF2, indicando que *MtLBD17/29a* sería un *target* de la vía miR390/*TAS3/ARFs* por unión

87

directa de MtARF2, el cual activaría su expresión en respuesta a *S. meliloti*. En conjunto los resultados sugieren una activación jerárquica de los factores de transcripción ARF y LBD durante la simbiosis, en la cual *MtARF2* activaría de manera directa la transcripción de *MtLBD17/29a*. Como perspectiva a futuro, se plantea investigar si otros miembros de la familia ARF, tales como *MtARF4a* o *MtARF4b*, son capaces de unirse de manera directa al promotor de *MtLBD17/29a* y si estos miembros de la familia ARF podrían actuar de manera sinérgica o cooperativa sobre la transcripción de *MtLBD17/29a*.

En este capítulo de tesis doctoral también hemos evidenciado que el promotor de *MtLBD17/29a* se expresa en el meristema de las raíces laterales y en el meristema y vasculatura de las raíces principales en *M. truncatula*. Estos resultados son reminiscentes de la expresión reportada previamente por Hobecker (2017) para los genes *MIR390a* y *MIR390b* y para los genes *MtARF3 y MtARF4a, targets* de la vía miR390/*TAS3,* los cuales también se expresan en la vasculatura de las raíces laterales y las raíces principales (Kirolinko et al., 2021). La inspección de los datos de RNA-seq permitió detectar una disminución de los niveles de transcriptos a las 72 horas luego de inducida la formación de raíces laterales, respecto de aquellas que no fueron inducidas. Estos datos sugieren que *MtLBD17/29a* sería regulado negativamente durante el desarrollo de las raíces laterales y por lo tanto podría ejercer una función en el inicio, emergencia y/o elongación de las raíces laterales.

Los datos reportados por Roux y colaboradores (2014) revelaron que la expresión del gen MtLBD17/29a es mayor en raíces que en los nódulos de 15 dpi y que en los nódulos la expresión se encuentra restringida a la zona meristemática. Estos datos, sumados a la mayor expresión observada en etapas tempranas del desarrollo del nódulo (4 dpi) a partir de los datos Benedito y colaboradores (2008), sugieren que este miembro de la familia LBD podría cumplir funciones en la activación de las divisiones celulares tanto al inicio de la formación del nódulo como en el mantenimiento de dichas divisiones en la región meristemática de nódulos que ya han desarrollado las diferentes zonas de diferenciación. Esta hipótesis encuentra sustento también en el análisis de las diferentes etapas del desarrollo de los nódulos a partir de los datos reportados por Schiessl y colaboradores (2019) en donde observamos que los niveles de MtLBD17/29a aumentan en las raíces luego de 24 y 36 hpi con S. meliloti, momento en el cual se han iniciado las divisiones celulares en el córtex interno y el periciclo de la raíz. A su vez, encontramos que el factor de transcripción NIN, el cual participa en eventos tempranos de la organogénesis del nódulo (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2013, 2019), sería requerido para la inducción de MtLBD17/29a en etapas tempranas de la simbiosis. Coincidentemente, los ensayos de RT-qPCR evidenciaron que la inducción de MtLBD17/29a en respuesta al factor Nod también se vio comprometida en las plantas mutantes nin, sugiriendo que la inducción de *MtLBD17/29a* requeriría de la función del factor de transcripción NIN. Otro miembro de la familia LBD, *MtLBD16*, también es controlado por el factor de transcripción NIN en etapas tempranas de la simbiosis (Soyano et al, 2019, Schiessl et al, 2019), sugiriendo que NIN podría regular la expresión de distintos miembros de la familia LBD en etapas iniciales de la simbiosis fijadora de nitrógeno. En ensayos de RT-qPCR también se observó que la expresión de *MtLBD17/29a* en respuesta al NF disminuye en mutantes *nfp* sugiriendo que el gen que codifica uno de los receptores del NF es requerido para mantener los niveles basales de *MtLBD17/29a* en las raíces de *M. truncatula*.

En su conjunto los resultados obtenidos en el presente capítulo nos permiten proponer como hipótesis que el gen *MtLBD17/29a*, blanco de acción de la vía miR390/*TAS3/ARFs*, participaría tanto en el control del desarrollo de raíces laterales como en la organogénesis y el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en *M. truncatula*. Esto abre interesantes perspectivas para el estudio de dicho gen en el desarrollo de órganos laterales subterráneos en plantas leguminosas. En el capítulo 3 de la presente tesis se presentan los resultados de la caracterización funcional del gen *MtLBD17/29a* que nos permitirán contrastar dicha hipótesis.

# Capítulo 3

"Las consecuencias de nuestras acciones son siempre tan complicadas, tan diversas, que predecir el futuro resulta ser un negocio muy difícil en sí"

Harry Potter de J. K. Rowling.

### Resultados

#### Análisis funcional del gen MtLBD17/29a mediante silenciamiento postranscripcional

Para dilucidar la función del gen MtLBD17/29a en la formación de órganos laterales en M. truncatula utilizamos una estrategia de silenciamiento génico postranscripcional del gen. Se generaron dos RNA de interferencia diferentes. El RNAi 1, de 154 pb, se diseñó a partir de una región del ORF que no se encuentra conservada en otros miembros de la familia LBD, mientras que el RNAi 2, de 243 pb, se diseñó sobre una región del extremo 3' UTR que es específica del transcripto MtLBD17/29a (Figura 46 A). Para verificar la especificidad de ambos fragmentos se realizó una búsqueda por homología de secuencia utilizando el algoritmo blastn y la base de datos genómica de M. truncatula. Los fragmentos de RNAi diseñados sólo mostraron similitud con las secuencias correspondientes a las regiones de MtLBD17/29 seleccionadas utilizando un valor de E de 0.001 de corte, sugiriendo que se trataría de secuencias específicas. Dichas secuencias se amplificaron mediante PCR utilizando cDNA de raíces WT como molde y las mismas fueron clonadas como repeticiones invertidas en el vector pK7GWIWG2D (II) bajo el control del promotor CaMV35S, obteniéndose dos construcciones denominadas LBD17/29a RNAi (1) y LBD17/29a RNAi (2). Dichas construcciones fueron introducidas en raíces de M. truncatula mediante transformación mediada por A. rhizogenes. Como control se utilizó la misma construcción GUS RNAi descripta en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral.

Para evaluar la reducción de los niveles de *MtLBD17/29a* en las raíces de las plantas obtenidas, se recolectaron las raíces transgénicas *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2), se extrajo el RNA total y se llevó a cabo la cuantificación del transcripto *LBD17/29a* mediante la técnica de RT-qPCR. El análisis de los niveles de *MtLBD17/29a* utilizando los *primers LBD17/29a* RNAi (2) F y R en raíces transformadas con *LBD17/29a* RNAi (1) mostró una reducción de más de 75 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control *GUS* RNAi (Figura 46 B). Por otra parte, los niveles de *MtLBD17/29a* utilizando los *primers LBD17/29a* utilizando los niveles de transcripto respecto a raíces control *GUS* RNAi (1) F y R en raíces transformadas con *LBD17/29a* RNAi (2) mostró una reducción de más de 75 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control *GUS* RNAi (1) F y R en raíces transformadas con *LBD17/29a* RNAi (2) mostró una reducción de más de 65 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control fuerá de 65 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control fuerá de 65 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control fuerá de 65 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control fuerá de 65 % en los niveles de transcripto respecto a raíces control (Figura 46 B).



**Figura 46. Silenciamiento postranscripcional de MtLBD17/29a** A. Esquema del gen MtLBD17/29a. Las fechas violetas y azules indican la posición de los *primers* usados para generar las construcciones *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2), respectivamente. B. Niveles de expresión relativa del transcripto MtLBD17/29a en raíces *LBD17/29a* RNAi (1), *LBD17/29a* RNAi (2) y *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 con p<0,05 (\*) en un *test t*-Student no apareado entre las muestras.

Por otra parte, verificamos si el silenciamiento producido por ambas construcciones de RNAi era específico del gen *MtLBD17/29a*, o afectaba a otros miembros de la familia LBD. Para ello se midieron, mediante la técnica de RT-qPCR, los niveles del transcripto de *MtLBD17/29b*, el homólogo más cercano a *MtLBD17/29a*. No se observó silenciamiento del transcripto *MtLBD17/29b* en las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) ni en las *LBD17/29a* RNAi (2) (Figura 47). A partir de estos resultados podemos inferir que ambas construcciones de RNAi silencian eficazmente al transcripto *MtLBD17/29a* y que dicho silenciamiento es específico.



**Figura 47. Niveles del transcripto** *MtLBD17/29b* en raíces silenciadas en *MtLBD17/29a*. Niveles de expresión del transcripto *MtLBD17/29b* en raíces *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM.

### El silenciamiento de *MtLBD17/29a* reduce la formación de nódulos en *M. truncatula*

Para determinar si el gen MtLBD17/29a es necesario para el correcto establecimiento de la interacción simbiótica en M. truncatula, se inocularon raíces de plantas LBD17/29a RNAi (1), LBD17/29a RNAi (2) y GUS RNAi, y se cuantificó el número de nódulos por raíz a los 7, 11, 14, 17 y 21 días post-inoculación. El silenciamiento del transcripto MtLBD17/29a produjo una reducción significativa del número de nódulos por raíz respecto a las plantas control GUS RNAi a todos los tiempos analizados. Dicha reducción fue significativa para las dos construcciones de RNAi utilizadas en comparación con las raíces GUS RNAi (Figura 48 A). Por otro lado, se evaluó el porcentaje de nódulos que adquirieron el color rosa característico causado por la expresión de leghemoglobina al inicio de la fijación de nitrógeno. Se observó una significativa disminución en el número de nódulos rosas en las plantas silenciadas en MtLBD17/29a en comparación con lo observado en las plantas control GUS RNAi (Figura 48 B) y la mayoría de los nódulos formados en las plantas LBD17/29a RNAi (1) fueron redondos, en contraste con los nódulos rosados y cilíndricos formados en las raíces GUS RNAi (Figura 48C), sugiriendo que la fijación de nitrógeno se ve comprometida en plantas LBD17/29a RNAi (1). Lo observado en cuanto al número de nódulos es coincidente con los resultados presentados en el primer capítulo de esta tesis en raíces silenciadas en MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b o mutantes arf4, reforzando la idea de que MtLBD17/29 actuaría río debajo de la vía miR390/TAS3/ARFs durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. Sin embargo, a diferencia de lo observado aquí para las raíces silenciadas en *MtLBD17/29a*, la coloración de los nódulos no se vio afectada por el silenciamiento de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4a/b*, indicando que *MtLBD17/29a* podría cumplir funciones que son independientes de estos miembros de la familia ARF.

Por otro lado, evaluamos la viabilidad de las bacterias dentro de los nódulos formados en las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *GUS* RNAi utilizando el colorante fluorescente SYTO9 (verde), que tiñe las bacterias vivas, y el ioduro de propidio (rojo), que permite visualizar las células con daño en la membrana y los núcleos intactos de células en activa división celular. En las raíces *GUS* RNAi, se pudo observar que la gran mayoría de las células del nódulo de la zona de fijación presentaron fluorescencia verde pero muy poco color rojo, indicando que las bacterias están vivas (Figura 48 D). En las plantas *LBD17/29a* RNAi (1), se pudo observar mayor fluorescencia roja, lo que indica que las células bacterianas se tiñeron con ioduro de propidio, es decir, que sus membranas estarín dañadas.



Figura 48. El silenciamiento de *MtLBD17/29a* altera el número y el desarrollo de nódulos en *M. truncatula*. A. Número de nódulos formados en raíces de *M. truncatula* control *GUS* RNAi (línea negra), *LBD17/29a* RNAi (1) (línea rosa) y *LBD17/29a* RNAi (2) (línea azul) fueron cuantificado a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi con *S. meliloti*. B. Porcentaje de nódulos blancos (inmaduros) y rosados (maduros) formados a los 21 dpi en raíces transformadas con *LBD17/29a* RNAi (1) o el control *GUS* RNAi. C. Imagen representativa de nódulos en plantas *LBD17/29a* RNAi (1) o el control *GUS* RNAi. C. Imagen representativa de nódulos en plantas *LBD17/29a* RNAi (1) o el control *GUS* RNAi a 21dpi. D. Tinción de nódulos de plantas *GUS* RNAi y *LBD17/29a* RNAi 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. Los asteriscos en A indican diferencias significativas con p<0,001 (\*\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*) en un *test t*-Student de dos colas no apareado entre las muestras.

Posteriormente, se evalúo el efecto del silenciamiento del transcripto *MtLBD17/29a* en el desarrollo la planta mediante la medida de peso seco de la parte aérea y del sistema radical en plantas crecidas sin nitrógeno al cabo de 21 dpi con *S. meliloti.* El peso seco de la parte aérea es considerado una estimación indirecta de la eficiencia de la fijación de nitrógeno. Para la construcción *LBD17/29a* RNAi (2) se observó una disminución significativa del peso seco de parte aérea, sin embargo, en el caso de la construcción *LBD17/29a* RNAi (1) la disminución del peso seco de la parte aérea fue muy leve y no significativa. Si se observó una disminución estadísticamente significativa en el peso seco de la raíz en ambas construcciones en comparación con las plantas control *GUS* RNAi (Figuras 49 A y 49 B).



**Figura 49. El silenciamiento de** *MtLBD17/29a* afecta el desarrollo la planta. A. Peso seco de parte aérea y B. peso seco de raíz de las plantas *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) determinados a los 21 dpi con *S. meliloti*. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 plantas en cada réplica biológica. Letras diferentes indican que los valores son significativamente diferentes en un *test t*-Student no apareado entre las muestras. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en un *test t*-Student de dos colas no apareadas con un valor de  $p \le 0,05$ .

#### MtLBD17/29a es requerido para la infección por rizobio

Teniendo en cuenta la disminución en el número de nódulos, su coloración y la baja viabilidad bacteriana observada en los nódulos de las plantas silenciadas en el transcripto *MtLBD17/29a*, nos preguntamos si ese fenotipo podría deberse a alguna falla en los eventos de infección. Para evaluar los eventos de infección se inocularon plantas *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) y *GUS* RNAi con una cepa de *S. meliloti* 1021 que expresa la proteína RFP y los eventos de infección se infección se visualizaron por microscopía de epifluorescencia. La cuantificación de la densidad

de hilos de infección muestra que las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) formaron una cantidad significativamente menor de hilos de infección que las raíces control *GUS* RNAi (Figura 50 A). Además, clasificamos los eventos de infección formados en cuatro grupos de acuerdo con su progresión tal como se describió en el primer capítulo de esta tesis: microcolonias, ITs en el pelo radical, ITs que alcanzan la base de las células epidérmicas o transvasan hacia otras células de la epidermis e ITs que alcanzan el córtex de la raíz (Figura 50 B). 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 *LBD17/29a* RNAi (1) o *LBD17/29a* RNAi (2), aunque el mayor porcentaje de los eventos de infección en las plantas silenciadas con la construcción *LBD17/29a* RNAi (1) se encontraba en el estadio de microcolonia. En su conjunto, estos resultados sugieren que *MtLBD17/29a* es requerido para la iniciación de los eventos de infección por rizobio, pero no para la progresión de dichos eventos hacia las células corticales, durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.



**Figura 50.** *MtLBD17/29a* es requerido para la iniciación de los eventos de infección por rizobio. A. Cuantificación de hilos de infección (ITs). Se muestra los ITs por centímetro de raíz en plantas *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) en comparación con las plantas control *GUS* RNAi. B. Porcentaje de eventos de infección que se encuentran detenidos en estadio de microcolonia, en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) o *GUS* RNAi a los 7 dpi. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 35 raíces por cada condición y ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,0001 (\*\*\*\*) en un *test t*-Student no apareado entre las muestras.

### El silenciamiento de *MtLBD17/29a* interfiere con la activación de los genes de nodulación tempranos *MtNSP1*, *MtNSP2* y *MtNF-YA1* durante la simbiosis

Con el objetivo de evaluar si el silenciamiento de MtLBD17/29a altera la respuesta de genes involucrados en la infección rizobiana y/u organogénesis del nódulo, se analizó la expresión de genes marcadores de nodulación tempranos. Entre dichos genes se incluyeron MtNSP1, MtNSP2, MtENOD40, MtNF-YA1, MtNF-YC1 y MtERN1 (Figura 51). No se observó diferencia en la expresión de MtENOD40, MtNF-YC1 y MtERN1 entre las plantas silenciadas y las plantas control GUS RNAi inoculadas y sin inocular. Los niveles de acumulación del transcripto MtNF-YA1 fueron menores en las raíces LBD17/29a RNAi (1) en comparación con las raíces control GUS RNAi luego de 48 hpi con el rizobio, sugiriendo que MtLBD17/29a podría actuar río arriba de MtNF-YA1 Por otra parte, los mRNA de que codifican los factores de transcripción GRAS MtNSP1 y MtNSP2 se acumularon a niveles significativamente menores en las raíces de LBD17/29a RNAi (1) que en las raíces de GUS RNAi después de la inoculación con S. meliloti. Cabe destacar que en el caso de *MtNSP2* los niveles de expresión en las plantas silenciadas sin inocular resultaron menores en comparación a las plantas GUS RNAi. Estos resultados indican que el factor de transcripción MtLBD17/29a podría ser necesario para la activación de MtNSP1 y MtNSP2 en respuesta a la infección por S. meliloti. Resultados semejantes se observaron previamente en el reporte publicado por Hobecker y colaboradores (2017), que demuestra que la activación del módulo miR390/TAS3 por sobreexpresión del miR390 afecta la inducción de los factores de transcripción MtNSP1 y MtNSP2 en respuesta a S. meliloti. En el mismo sentido, los resultados descriptos en el capítulo 1 del presente trabajo de tesis doctoral indicaron que el silenciamiento de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b afecta la inducción de la expresión de MtNSP2 en respuesta al rizobio. La coincidencia de resultados observada entre plantas que sobrexpresan miR390, aquellas silenciadas en los factores de transcripción de tipo MtARF y las silenciadas en MtLBD17/29a sugieren que el módulo miR390/TAS3/ARFs y MtLBD29/17a formarían parte de la misma vía de activación de MtNSP1 y MtNSP2, sustentando la hipótesis de que MtLBD17/29a actuarían río abajo de MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b y río arriba de los genes que codifican los factores de transcripción de tipo GRAS MtNSP1 y MtNSP2. El análisis de la secuencia del promotor de MtNSP2 nos permitió identificar sitios de unión de factores de transcripción de la familia LBD (Figura 51 B). A su vez, teniendo en cuenta que MtARF2 se une manera directa a MtNSP2 (Figura 39 del capítulo 2 de esta Tesis), los resultados obtenidos nos permiten hipotetizar que los factores de transcripción MtARF y MtLBD17/29a podrían actuar de manera cooperativa en la activación de MtNSP2.


Figura 51. El silenciamiento de *MtLBD17/29a* interfiere con la regulación positiva de *MtNSP1*, *MtNSP2* y *MtNF-YA1* durante la nodulación. A. Niveles de expresión de marcadores de nodulación temprana *MtNSP1*, *MtNSP2*, *MtENOD40*, *MtNF-YA1*, *MtNF-YC1* y *MtERN1* en raíces *GUS* y *LBD17/29a* RNAi (1) a las 48 hpi con *S. meliloti* (Sm, barras violetas) o *mock* (barras blancas). Los niveles de transcriptos fueron determinados mediante RT-qPCR, normalizados por los niveles del transcripto de referencia *HIS3L* y expresados en relación a la muestra *GUS* RNAi mock, a la cual se le asignó un valor de 1. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en un *test t-*Student de dos colas no apareadas con un valor de p  $\leq$  0,05. B. Esquema de la secuencia del promotor del gen *MtNSP2*; las cajas violetas y celestes indican las secuencias de reconocimiento de los factores de transcripción LBD, la fecha negra indica el SIT y la escala es de 2kb.

#### El silenciamiento de MtLBD17/29a afecta la arquitectura de la raíz

Teniendo en cuenta los datos de expresión publicados por Benedito y colaboradores (2008) presentados en el capítulo 2, en los cuales los valores de expresión del transcripto *MtLBD17/29a* son mayores en las raíces que en el resto de los órganos de la planta y que observamos expresión del promotor en raíces principales y raíces laterales, nos propusimos estudiar la función de *MtLBD17/29a* en la arquitectura de las raíces de *M. truncatula*. Plantas compuestas *LBD17/29a* RNAi (1), *LBD17/29a* RNAi (2) y *GUS* RNAi se crecieron en placas de acrílico cuadradas

conteniendo medio Fahraeus, el cual no contiene una fuente de nitrógeno. Al cabo de 15 días en dichas condiciones se cuantificaron la longitud de las raíces principales y las raíces laterales, así como también la densidad de raíces laterales (número de raíces laterales/cm de raíz principal). La longitud de las raíces principales y las raíces laterales fue menor en plantas silenciadas *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) en comparación con las plantas control *GUS* RNAi (Figuras 52 A, 52 B y 52 E). A su vez, se observó que la densidad de raíces laterales fue mayor en las plantas silenciadas que en las plantas *GUS* RNAi (Figuras 52 C, 52 E). Además, se pudo observar una disminución en la longitud de la parte aérea en las plantas silenciadas con respecto a las plantas control (Figuras 52 D y 52 E).



Figura 52. Efecto del silenciamiento de *MtLBD17/29a* sobre la arquitectura de raíz en plantas de 15 días sin nitrógeno. Longitud de A. raíces principales (RP), B. raíces laterales (RLs), C. densidad de las RLs, D. longitud de parte aérea cuantificadas en las plantas compuestas *GUS* RNAi y *LBD17/29a* RNAi (1). E. Foto de las plantas compuestas *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2). Los datos corresponden a la media ± el desvío estándar con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en un *test t*-Student de dos colas no apareadas con un valor de p  $\leq 0,05$  (\*), p< 0,01 (\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*).

Para profundizar nuestro estudio en la arquitectura de raíz e inferir si el fenotipo observado fue causado por la deficiencia de nitrógeno en el medio, analizamos el fenotipo de raíz en plantas

de 15 días de crecimiento en placas de acrílico cuadradas conteniendo medio Fahraeus suplementado con nitrógeno. Se pudo observar una disminución en la longitud de raíces principales en las raíces *LBD17/29a* RNAi (2) y una disminución en la longitud de las raíces laterales para la construcción *LBD17/29a* RNAi (1) como para la *LBD17/29a* RNAi (2) (Figuras 53 A, 53 B y 53 E). Además, se observó un aumento en la densidad de las raíces laterales en comparación con las plantas control *GUS* RNAi para ambas construcciones (Figuras 53 C y 53 E). Por otro lado, no hubo diferencias en la longitud de parte aérea en las plantas *LBD17/29a* RNAi (1), pero si se observó una disminución de la longitud de parte aérea en las plantas *LBD17/29a* RNAi (1), pero si se observó una disminución de la longitud de parte aérea en las plantas *LBD17/29a* RNAi (2) en comparación con las plantas control *GUS* RNAi (*S* RNAi (Figuras 53 D y 53 E).



**Figura 53. El silenciamiento de** *LBD17/29a* **afecta la de la arquitectura de raíz.** Longitud de A. raíces principales (RP), B. raíces laterales (RLs), C. medida de la densidad de las raíces laterales y D. longitud de parte aérea cuantificadas en las plantas compuestas *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2). E. Fotos representativas de plantas compuestas *GUS* RNAi, *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2). Los datos corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en un *test t*-Student de dos colas no apareadas con un valor de p ≤ 0,05 (\*), p< 0,01 (\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*).

Teniendo en cuenta lo observado en el capítulo 1 de esta tesis donde no se detectaron diferencias en los tamaños de las células en las plantas *ARF2/3/4* RNAi comparadas con el control, pero si se observó una disminución significativa en el número de células en dichas plantas silenciadas con respecto a las plantas control, nos propusimos analizar si las plantas que llevan la construcción *LBD17/29a* RNAi (1) presentaba diferencias en las células en la zona de elongación de la raíz (Figura 54). Se pudo observar que las plantas *LBD17/29a* RNAi (1) presentan células más alargadas con respecto a las plantas control y, además, posee un menor número de células en la zona de elongación. Estos datos sugieren que el menor crecimiento de las raíces principales y laterales observado en las plantas silenciadas en *MtLBD17/29a* podría ser causado por una menor tasa de divisiones celulares.



**Figura 54. El silenciamiento de** *MtLBD17/29a* **afecta la longitud y el número de células en la zona de elongación**. A. Longitud promedio de las células de la raíz principal en la zona de elongación determinada en raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *GUS* RNAi. B. Número de células de la raíz principal en la zona meristemática de elongación observadas en raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *GUS* RNAi. C. Imágenes de la punta de la raíz principal de plantas *LBD17/29a* RNAi (1) y *GUS* RNAi. Las flechas indican la zona de elongación. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,001 (\*\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*) en un *test t*-Student no apareado de dos colas entre las muestras.

Como se mencionó anteriormente, la formación y elongación de las raíces laterales es regulada por la acción de las auxinas. Por lo tanto, decidimos investigar la sensibilidad a auxinas de las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y (2). Para ello se traspasaron las plantas *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) a medio Fahraeus suplementado con nitrógeno como control y al mismo

medio conteniendo 10 µM de IAA. Al cabo de 15 días se determinó el crecimiento de la raíz principal como una medida de la sensibilidad a las auxinas, dado que altas concentraciones de auxinas inhiben el crecimiento de la raíz principal. Las raíces *LBD17/29a* RNAi (1) y *LBD17/29a* RNAi (2) mostraron una menor inhibición del crecimiento de las raíces principales en respuesta a IAA con respecto a las plantas *GUS* RNAi, indicando que las raíces silenciadas en el transcripto *MtLBD17/29a* serían menos sensibles al tratamiento con auxinas exógenas (Figura 55). Cabe destacar que las raíces principales de las plantas silenciadas en *MtLBD17/29* exhibieron una raíz principal significativamente más corta en ausencia de auxina exógena que las *GUS* RNAi.



Figura 55. Las plantas silenciadas en *MtLBD17/29a* son menos sensibles a las auxinas exógenas. Longitud de las raíces principales cuantificadas en las plantas *LBD17/29a* RNAi (1), *LBD17/29a* RNAi (2) y *GUS* RNAi luego del tratamiento con 10  $\mu$ M de IAA o sin tratamiento en plantas crecidas en medio Fahraeus suplementado con nitrógeno. Los datos son representativos de dos réplicas biológicas independientes con más de 10 raíces por ensayo. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar y las letras indican las diferencias significativas entre las muestras en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05.

A partir de los resultados presentados en esta sección pudimos concluir que el silenciamiento del transcripto *MtLBD17/29a* afecta la arquitectura de raíz en plantas de *M. truncatula,* disminuyendo el crecimiento/elongación de las raíces principales y raíces laterales, y aumentando la iniciación de las raíces laterales. A su vez, las raíces silenciadas en *MtLBD17/29a* presentaron una sensibilidad a auxinas reducida.

#### Análisis funcional del gen MtLBD17/29a por sobreexpresión

Para continuar con el estudio de la función de *MtLBD17/29a* en la formación de raíces laterales y en la asociación simbiótica con *S. meliloti* se generaron plantas que sobreexpresan dicho gen. Para ello se clonó el marco abierto de lectura del gen *MtLBD17/29a* en el vector pK7WG2D, 1, el cual permite la expresión de genes bajo el control del promotor del virus de mosaico de la coliflor CaMV35 y lleva además una copia del gen *gfp* para la visualización de las raíces transgénicas mediante microscopia de fluorescencia. De esta manera se obtuvo la construcción denominada OXLBD17/29a, la cual se introdujo en la cepa de la bacteria *A. rhizogenes* Arqua 1. Dicha cepa, junto con otra transformada con el vector pK7WG2D, 1 (EV, empty vector) como control, se utilizaron en la transformación de raíces de *M. truncatula*.

Para evaluar si efectivamente las raíces OXLBD17/29a presentaban niveles aumentados del transcripto *MtLBD17/29a*, se realizó una reacción de RT-qPCR sobre cDNA de raíces de plantas EV y OXLBD17/29a a 48 hpi con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*). Se puede observar que los niveles relativos de expresión del transcripto *MtLBD17/29a* en raíces OXLBD17/29a fueron significativamente mayores, con un aumento de aproximadamente 100 veces a los obtenidos en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) (Figura 56). Estos resultados indican que fue posible sobreexpresar *MtLBD17/29a* en raíces de *M. truncatula*.



*MtLBD17/29a* 

**Figura 56. Sobreexpresión de MtLBD17/29a en raíces de M. truncatula.** Niveles de expresión relativa del transcripto *MtLBD17/29a* en raíces que sobreexpresan *MtLBD17/29a* (OXLBD17/29a) y raíces transformadas con el vector vacío (EV) como control. Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,05 en un *test t*-Student de dos colas no apareado entre las muestras.

#### La sobreexpresión de *MtLBD17/29a* afecta la nodulación y la infección por rizobio

Para analizar el efecto de la sobreexpresión del transcripto *MtLBD17/29a* en la nodulación se crecieron plantas OXLBD17/29a y plantas EV como control, se inocularon las raíces con *S. meliloti* y se evaluó el número de nódulos por raíz transgénica a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi. En la Figura 57 se puede observar que la sobreexpresión del transcripto produce una reducción significativa del número de nódulos por raíz respecto a las plantas control EV, y que esa reducción es estadísticamente significativa a todos los tiempos analizados.



**Figura 57. La sobreexpresión de** *MtLBD17/29a* **afecta el número de nódulos**. Cinética de nodulación: el número de nódulos formados en raíces de *M. truncatula* control EV (línea negra) y OXLBD17/29a (línea violeta) fueron cuantificado a los 7, 11, 14, 17 y 21 dpi con *S. meliloti*. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,001 (\*\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*) en un *test t*-Student no apareado de dos colas entre las muestras.

Con el fin de evaluar si la infección por rizobio también se veía afectada por la sobrexpresión de *MtLBD17/29a*, se inocularon plantas OXLBD17/29a y plantas EV con la cepa de *S. meliloti* que expresa la proteína RFP y se evaluaron la densidad de eventos de infección y su progresión (Figura 58). Se observó que las plantas OXLBD17/29a poseen una menor densidad de ITs por centímetro de raíz con respecto al control, con una diferencia cercana al 50 % a los 7 días post-inoculación (Figura 50 A). Al igual que lo observado en las raíces silenciadas en *MtLBD17/29a*, la sobrexpresión de este gen no afectó la progresión de los eventos de infección en los distintos estadios estudiados (Figura 58 B).



**Figura 58.** La sobrexpresión de *MtLBD17/29a* altera la iniciación de los eventos de infección. A. Cuantificación de hilos de infección (ITs). Se muestra el número de ITs por centímetro de raíz en plantas EV (negro) y OXLBD17/29a (violeta). B. Porcentaje de los eventos de infección que se encuentran detenidos en estadio de microcolonia, en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces OXLBD17/29a y EV a los 7 dpi. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 35 raíces por cada condición y ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con p<0,0001 (\*\*\*\*) en un *test t*-Student no apareado de dos colas entre las muestras.

### La sobreexpresión de *MtLBD17/29a* interfiere con la regulación de genes marcadores de la nodulación

Para estudiar si la sobreexpresión de *MtLBD17/29a* altera la formación de nódulos y la iniciación de los eventos de infección mediante la regulación de genes involucrados en la infección rizobiana y/u organogénesis del nódulo, se analizó la expresión de un set de genes marcadores de nodulación tempranos. Los niveles de mRNAs de estos genes fueron analizados mediante RTqPCR en raíces de plantas OXLBD17/29a y EV al cabo de 48 hpi con *S. meliloti* o con agua como control (Figura 59). Se pudo observar que la inducción de *MtLBD17/29a* en comparación con las raíces control EV, mientras que los niveles de los transcriptos *MtENOD40* y *MtNF-YA1* fueron mayores en las raíces OXLBD17/29a que en las plantas EV sin inocular, alcanzando niveles semejantes a los observados en las raíces EV y OXLBD17/29a inoculadas (Figura 59). Por otro lado, si bien los niveles de expresión de *MtNF-YC1*, *MtNSP1* y *MtNSP2* aumentaron en las raíces OXLBD17/29a en respuesta al rizobio, este incremento fue mucho menor que en las raíces EV (Figura 59).



**Figura 59. Efecto de la sobreexpresión de LBD17/29a sobre los genes marcadores de la nodulación**. Los niveles de acumulación de los transcriptos *MtNIN*, *MtENOD11* y *MtNSP2* fueron cuantificados en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o en las raíces OXLBD17/29a inoculadas con agua (mock) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los niveles de los transcriptos fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05.

Este resultado indica que la alteración de los niveles de *MtLBD17/29a* afecta directa o indirectamente la expresión de *MtNSP1* y *MtNSP2*, de manera similar a lo observado previamente para las plantas que expresan niveles reducidos de *MtARF2*, *MtARF3* y *MtARF4* en el capítulo 1 (Kirolinko et al., 2021) o de *MtLBD17/29a* (Figura 51 de este capítulo de tesis). En conjunto, los resultados obtenidos acerca del silenciamiento y la sobrexpresión de *MtLBD17/29a* sugieren que se requiere de una fina regulación de los niveles de transcripto de este gen para asegurar la regulación positiva de *MtNSP1* y *MtNSP2* en respuesta al rizobio y una eficiente formación de nódulos fijadores de nitrógeno en *M. truncatula*.

#### Análisis de la arquitectura de raíz en plantas OXLBD17/29a

Teniendo en cuenta el fenotipo observado en las plantas con niveles reducidos de *MtLBD17/29a*, nos propusimos evaluar el posible efecto de la sobreexpresión de este gen sobre la arquitectura de la raíz. Para ello se crecieron plantas compuestas OXLBD17/29a y EV en medio Fahraeus sólido carente de nitrógeno. Luego de 15 días creciendo en estas condiciones pudimos observar

que la longitud de las raíces principales y las raíces laterales fue mayor en las plantas sobreexpresantes con respecto a las plantas control EV (Figuras 60 A, 60 B y 60 E). Además, las plantas OXLBD17/29a presentaron una menor densidad de raíces laterales por centímetro de raíz que las plantas EV (Figuras 60 C y 60 E). Este fenotipo es el opuesto al observado en las raíces silenciadas en *MtLBD17/29a*. Sin embargo, la longitud de la parte aérea fue levemente menor en las plantas OXLBD17/29a respecto a las plantas EV (Figuras 60 D y 60 E).



**Figura 60. La sobreexpresión de** *MtLBD17/29a* **afecta la arquitectura de raíz en ausencia de nitrógeno.** Longitud de A. raíces principales (RP), B. raíces laterales (RLs), C. densidad de las RLs D. longitud de parte aérea cuantificadas en las plantas compuestas EV y OXLBD17/29a. E. Foto de las plantas EV y OXLBD17/29a. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes, corresponden a la media ± el desvío estándar con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Los asteriscos indican que los valores de OXLBD17/29a son significativamente diferentes de los EV en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,001 (\*\*\*) y p<0,0001 (\*\*\*\*).

Además, se crecieron plantas compuestas OXLBD17/29a y EV en medio Fahraeus suplementado con nitrógeno. En estas condiciones, no se observaron diferencias significativas en la longitud de las raíces principales entre las plantas OXLBD17/29a y las EV (Figuras 61 A). Sin embargo, la longitud de las raíces laterales fue mayor en plantas OXLBD17/29a en comparación con las plantas control EV (Figuras 61 B y 61 E). También, se pudo observar que la densidad de raíces laterales fue menor en plantas OXLBD17/29a que en las plantas EV (Figuras 61 C y 61 E). Con el fin de evaluar si el efecto en la arquitectura de raíz afectaba el desarrollo de la parte aérea de la planta se midió la longitud de la parte aérea de las plantas que sobreexpresan *MtLBD17/29a* en

presencia de nitrógeno, se observó una disminución en la longitud de la parte aérea de las plantas que sobreexpresan *MtLBD17/29a* comparado con las EV (Figuras 61 E y 61 F).



**Figura 61. La sobreexpresión de** *MtLBD17/29a* altera la arquitectura de raíz en presencia de nitrógeno. A. Longitud de las raíces principales (RP), B. Raíces laterales (RLs) y C. Densidad de las raíces laterales D. longitud de parte aérea medido en las plantas compuestas EV y OXLBD17/29a crecidas 15 días en presencia de nitrógeno. E. Foto de las plantas EV y OXLBD17/29a. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes. Los valores corresponden a la media ± el desvío estándar con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Los asteriscos indican que los valores de las plantas OXLBD17/29a son significativamente diferentes de los de las plantas EV en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,01 (\*\*) p<0,001 (\*\*\*).

Por otra parte, evaluamos la sensibilidad de las raíces OXLBD17/29a a la aplicación de auxinas exógenas. Plantas OXLBD17/29a y plantas control EV fueron crecidas en medio Fahraeus suplementado con nitrógeno con o sin el agregado de 10  $\mu$ M de IAA. Al cabo de 15 días se determinó el crecimiento de las raíces principales (Figura 62). Las raíces OXLBD17/29a crecidas en 10  $\mu$ M de IAA mostraron una disminución del crecimiento de las raíces principales similar a las plantas EV, indicando que las raíces que sobreexpresan *MtLBD17/29a* no tendrían afectada la sensibilidad a auxinas exógenas. En conjunto, estos resultados nos indican que la sobreexpresión de *MtLBD17/29a* altera la arquitectura de la raíz y el desarrollo de la planta, pero no la sensibilidad a las auxinas.



Figura 62. La sobreexpresión de LBD17/29a en respuesta a auxinas exógenas. Longitud de las raíces principales cuantificadas en las plantas OXLBD17/29a y plantas EV, con del tratamiento con 10  $\mu$ M de IAA o Fahraeus como control. Los datos son representativos de dos réplicas biológicas independientes con más de 15 raíces por ensayo. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar y las letras indican las diferencias significativas entre las muestras en un *test t*-Student no apareado de dos colas con p<0,05.

#### Discusión

#### MtLBD17/29a controla la arquitectura de las raíces de M. truncatula

En este capítulo, hemos presentado evidencia que indica que MtLBD17/29a juega un papel positivo en el alargamiento de las raíces principales y laterales, pero negativo en el inicio de las raíces laterales. Estos resultados son coincidentes con lo observado en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral, en donde observamos que los genes MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b también promueven la elongación de las raíces principales y laterales, pero limitan la iniciación de nuevas raíces laterales. Teniendo en cuenta los resultados presentados en el capítulo 2 que señalan que MtLBD17/29a es target de la vía miR390/TAS3/ARF, que el promotor de dicho gen es capaz de unir al menos MtARF2, y las evidencias obtenidas en este capítulo a partir del análisis fenotípico de plantas silenciadas y sobrexpresantes de MtLBD17/29a podemos sugerir que MtLBD17/29a y el módulo miR390/TAS3/ARFs formarían parte de la misma vía de señalización que contribuye a modular la arquitectura de raíz en M. truncatula. Cabe mencionar el fenotipo de densidad de raíces laterales observado aquí para plantas silenciadas o sobrexpresantes en MtLBD17/29a contrasta con lo encontrado previamente en A. thaliana, en donde la sobreexpresión de AtLBD16 o AtLBD29 rescata parcialmente el fenotipo de la doble mutante arf7/arf19, promoviendo la iniciación de raíces laterales (Okushima et al., 2007). Además, una mutante en un gen de la familia LBD de tomate denominado SBRL (por sus siglas en ingles de SHOOT BORNE ROOTLESS) presenta una disminución en la formación y la densidad de raíces laterales, sugiriendo que SBRL también promueve la iniciación de las raíces laterales (Omary et al., 2022). Los fenotipos contrastantes en cuanto a la densidad de las raíces laterales en dobles mutante lbd17/lbd29 en A. thaliana y mutantes sbrl de tomate (Omary et al, 2022) y los resultados observados aquí en plantas de M. truncatula silenciadas o sobreexpresantes de MtLBD17/29a sugieren que la función del factor de transcripción LBD17/29a en el control de la arquitectura de raíz podría ser dependiente de la especie. Estas diferencias también podrían atribuirse a diferencias entre una mutación nula de ambos genes en plantas completas de A. thaliana respecto del uso de plantas compuestas en M. truncatula, en las cuales sólo la raíz es transgénica mientras que la parte aérea es WT. Teniendo en cuenta que los genes de la clase IB de la familia LBD controlan genes que participan en la biosíntesis de auxinas y que las auxinas se transportan por los haces vasculares principalmente de la parte aérea a la raíz -si bien existe una proporción de auxina sintetizada en la raíz (Waidmann et al., 2020)-, no es posible descartar que las diferencias observadas entre A. thaliana y tomate y las descriptas aquí para M. truncatula también podrían deberse a diferencias en la concentración de auxinas en las células fundadoras de las raíces laterales. Por otra parte, mutantes en otro miembro de la familia LBD de *M. truncatula*, *MtLBD16*, disminuyen el número de raíces laterales mientras que su sobreexpresión provoca un aumento en el número de raíces laterales (Schiessl et al., 2019). Esto sugiere que *MtLBD16* y *MtLBD17/29a* desempeñarían funciones opuestas en la iniciación de las raíces laterales.

En este capítulo encontramos también que la menor elongación de las raíces principales y laterales en plantas que fueron silenciadas en *MtLBD17/29a* se deba posiblemente a una disminución del número de células en la punta de la raíz, sugiriendo que dicho gen podría promover la activación de las divisiones celulares requeridas para el crecimiento radical. Reportes previos llevados a cabo en *A. thaliana* han demostrado que un miembro de la familia LBD, AtLBD18, regula la activación transcripcional de los genes del ciclo celular *CICLINAB1,1* y *KINASA DEPENDIENTE DE CICLINA A1,1* (Lee et al., 2015). Este dato permitiría hipotetizar que *MtLBD17/29a* podría modular la elongación de las raíces promoviendo la activación de genes del ciclo celular, y consecuentemente las divisiones celulares en la punta de la raíz. Los datos de expresión espacial, que indican que el promotor de *MtLBD17/29a* es activo en los meristemas de las raíces principales y laterales apoyarían dicha hipótesis. Ensayos futuros de ChIP-seq, ChIP-PCR o de transactivación permitirán poner a prueba dicha hipótesis.

#### MtLBD17/29a controla la organogénesis de nódulos de M. truncatula

En el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno, en este capítulo de tesis observamos que tanto el aumento como la disminución de los niveles de *MtLBD17/29a* afectan negativamente el número de nódulos y la densidad de los eventos de infección por rizobio. Esto sugiere que los niveles de *MtLBD17/29a* deben ser finamente regulados para el establecimiento exitoso de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Los resultados obtenidos al silenciar el gen *MtLBD17/29a* son reminiscentes de lo observado en las raíces silenciadas en *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b* o en la mutante *arf4a* descripto en el capítulo 1 en donde se encontró afectada la infección y la organogénesis del nódulo, sustentando la hipótesis que *MtLBD17/29a* actúa en la misma vía y río abajo del módulo miR390/*TAS3/ARF* para mediar la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Cabe destacar que el fenotipo de menor nodulación observado al sobreexpresar *MtLBD17/29a* puede deberse a que se utilizó el promotor CaMV35S, el cual se expresa constitutiva y ubicuamente en la raíz, y que la sobreexpresión ectópica de *MtLBD17/29a* 

112

estar regulando otros genes que poseen sitios de unión para factores de transcripción de la familia LBD que alteran negativamente la formación de nódulos o la infección rizobiana. Alternativamente, el factor de transcripción MtLBD17/29a podría formar complejos transcripcionales con otros miembros de la familia LBD o interaccionar con factores de transcripción pertenecientes a otras familias, actuando de forma cooperativa. En este contexto, tanto el aumento como la reducción de los niveles de MtLBD17/29a podrían producir una alteración en la estequiometría de los componentes de dichos complejos, dando lugar a complejos transcripcionales no funcionales. Esta hipótesis encuentra sustento en un trabajo previo realizado en A. thaliana, donde se demostró que la homodimerización de LBD16 o LBD18 a través de un cierre de leucinas es crítica para su rol como activador trancripcional y su función biológica en el control de la formación de raíces laterales en A. thaliana (Lee et al., 2017). Además, la sobrexpresión de los LBD podría entonces resultar en una titulación de otros componentes del complejo transcripcional. Este dato resulta interesante ya que MtLBD16 y MtLBD17/29a pertenecen a un mismo clado filogenético, y ha sido reportado que los miembros de un mismo clado dentro de la familia LBD poseen funciones moleculares similares (Zhang et al, 2022). En este sentido, se ha demostrado que la mutante lbd16 de M. truncatula presenta una disminución del número de nódulos (Schiessl et al., 2019) respecto de las plantas WT, sustentando la idea de que los miembros de la clase IB de la familia LBD estarían implicados en la formación de nódulos en plantas leguminosas.

A su vez, la alteración de los niveles de *MtLBD17/29a* produjo una severa disminución en el número de eventos de infección bacteriana, sugiriendo que este gen desempeñaría una función importante en el inicio de las infecciones bacterianas que ocurren a través del pelo radical. En *A. thaliana* se demostrado que el gen *AtLBD18* es capaz de regular un subconjunto de genes que codifican expansinas, particularmente *EXP14* y *EXP17*, durante la respuesta a un aumento en la concentración de auxinas, facilitando la aparición de raíces laterales mediante el ablandamiento y remodelación de la pared celular (Lee et al., 2013). Teniendo en cuenta que la formación de los hilos de infección necesita del remodelación de la pared celular del pelo radical para dar lugar a la formación del bolsillo de infección y posterior elongación del hilo de infección (Su et al., 2023), la disminución en los eventos de infección que observamos al silenciar o sobreexpresar el gen *MtLBD17/29a* podría deberse a defectos en la remodelación de la pared celular necesaria para dar inicio a los eventos de infección bacteriana en etapas tempranas de la simbiosis .

#### MtLBD17/29a y su relación con marcadores de nodulación temprana

En este capítulo de tesis también hemos evidenciado que MtLBD17/29a es necesario para la inducción completa en respuesta a S. meliloti de los genes MtNSP1 y MtNSP2, dos genes esenciales para la nodulación. Esto coinciden con resultados anteriores presentados en el capítulo 1 donde demostramos que los factores de transcripción MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b podrían interceptar la vía de señalización del NF aguas arriba de MtNSP2 y también con lo descripto previamente en las raíces que sobreexpresan miR390, las cuales exhiben niveles reducidos de MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b, en donde no se registra un aumento de la expresión de MtNSP1 y MtNSP2 en M. truncatula en respuesta a los rizobios (Hobecker et al., 2017). Los niveles de expresión de MtNSP2 también se vieron afectado al sobreexpresar MtLBD17/29a. Lo que sugiere que el gen MtLBD17/29a regularía los marcadores de nodulación temprana necesarios para la formación de nódulos funcionales en *M. truncatula*. Esta regulación podría ser propia de las plantas leguminosas ya que el promotor de MtNSP2 posee tres sitios de unión putativos para factores de transcripción de la familia LBD y dos sitios de unión ARE y un análisis de secuencia promotora del mejor homólogo a MtNSP2 en P. vulgaris reveló que la región promotora de este gen también posee dos sitios de unión para LBDs y dos sitios de unión ARE. Curiosamente, el análisis de la secuencia promotora de mejor homólogo a MtNSP2 en A. thaliana, AtNSP2, permitió determinar que dicho gen no posee sitios de unión a factores de transcripción de tipo ARF o LBD, al menos en los 2 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Figura 63). Este análisis permite especular que la regulación de MtNSP2 por LBDs y ARFs haya sido adquirida por las plantas leguminosas. Sin embargo se requiere de estudios a nivel de múltiples especies leguminosas y no leguminosas para contrastar dicha hipótesis. Dado que MtNSP2 es target directo de MtARF2, es posible especular que MtARF2 y/o algún otro miembro de la familia ARF podrían actuar de manera conjunta con MtLBD17/29a para promover la activación transcripcional de MtNSP2. Estudios llevados a cabo en A. thaliana revelaron que existe un feedback positivo entre AtLBD18 y AtARF7 y AtARF19, en el cual AtARF7 y AtARF19 controlan la expresión de AtLBD18, y luego AtLBD18 actúa cooperativa con AtARF7 y AtARF19 potenciando la expresión de AtARF19, promoviendo así la iniciación y emergencia de las raíces laterales (Pandey et al., 2018). De manera similar es posible especular que MtLBD17/29a y los factores de transcripción de la familia ARF podrían actuar cooperativamente modulando la expresión de MtNSP2. Ensayos futuros ChIP-PCR en plantas que expresan la proteína MtLBD17/29a fusionada a un epitope FLAG permitirán poner a prueba esta hipótesis evaluando si MtNSP2 es también target directo de MtLBD17/29a. Otros estudios permitirán evaluar si otros miembros de la familia ARF (p. ej. MtARF4a) también son capaces de unirse al promotor de

*MtLBD17/29a*, promoviendo así la activación transcripcional de dicho gen durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. La cercanía encontrada entre los sitios ARE y de unión de LBD en plantas leguminosas, plantea el interrogante de si hay una interacción directa proteína-proteína entre los miembros de la familia ARF y MtLBD17/29a (Figura 63).



Figura 63. Elementos de respuesta a auxina (ARE) y de unión a LBD presente en los promotores de los genes NSP2 en M. truncatula, P. vulgaris y A. thaliana. Se esquematizan 2 Kb de la región promotora de NSP2 para las diferentes especies, así como los elementos ARE presentes en cada promotor (cajitas rosas) y los sitios de unión a LBD (cajitas celestes). Las flechas negras indican el sitio de inicio de la transcripción

## Modelo hipotético del modo de acción de la vía miR390/TAS3/ARFs y MtLBD17/29a en el desarrollo de raíz y simbiosis fijadora de nitrógeno

En base a todos los resultados presentados en la presente tesis generamos un modelo que vincula la vía miR390/TAS3/ARFs y el gen *MtLBD17/29a* con la formación de raíces laterales, y a su vez vincula estos factores de transcripción con los marcadores tempranos de la nodulación y la organogénesis de los nódulos. En este modelo el módulo miR390/TAS3 modula negativamente a nivel post transcripcional a *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4*. La expresión de *MtARF2, MtARF3* y *MtARF4a/b*, en especial *MtARF4a/b*, requiere del factor de transcripción MtNF-YA1. A su vez, MtARF2 se une al promotor de *MtLBD17/29a* y activa su expresión. Tanto los miembros de la familia ARF como MtLBD17/29a modulan la arquitectura de la raíz promoviendo la elongación de las raíces principales y laterales. MtARF2 también es capaz de unirse al promotor de *MtARF4a,* y dado que MtARF4a desempeña una función importante en la arquitectura de la raíz, esto podría representar una retroalimentación positiva para promover la elongación de las raíces primarias. Por otra parte, MtARF2 se une al promotor de *MtNSP2*, entrecruzándose así con la vía de señalización de la nodulación. *MtLBD17/29a* es

regulado directa o indirectamente por MtNIN y a su vez, también modula la expresión de *MtNSP1* y *MtNSP2*, y *MtNF-YA1* promoviendo a la infección rizobiana y la organogénesis de nódulos necesaria para la FBN(Figura 64).



**Figura 64. Esquema de la intersección entre la vía de miR390/TAS3/ARFs/LBD17/29a y de señalización de la nodulación y la arquitectura de raíz en M. truncatula.** La vía miR390/TAS3, mediante la producción de tasiARFs, regula negativamente los niveles de acumulación de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3, MtARF4. A su vez, regula negativamente la expresión de MtNSP1/MtNSP2, dos genes requeridos para la nodulación (Hobecker et al., 2017). La vía de señalización de la nodulación involucra la percepción de Nod Factor (NF) iniciando una cascada jerárquica de factores de transcripción que incluyen a MtNIN, MtNSP1 y MtNSP2. El factor de transcripción MtN/N regula la expresión de los factores de transcripción MtARF2 se une a los promotores de MtLBD17/29a, MtNSP2 y MtARF4a. Los factores de transcripción MtARF2, MtARF3, MtARF4 y MtLBD17/29a regulan el desarrollo de la arquitectura de raíz, la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo en raíces de M. truncatula.

## Conclusiones

"¿Después de todo este tiempo? Siempre"

Harry Potter de J. K. Rowling.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral describen la importancia biológica de genes involucrados en la respuesta a auxinas y su rol en la organogénesis de órganos laterales en raíces de plantas de *M. truncatula*. Estos resultados contribuyen a avanzar en el conocimiento básico sobre la función de las hormonas vegetales, particularmente las auxinas, en la formación de dos órganos laterales, raíces laterales y nódulos fijadores de nitrógeno, que participan en la captura de agua y nutrientes, y por lo tanto impactan directamente sobre el crecimiento vegetal, la formación de biomasa y la productividad de los cultivos de leguminosas.

En el primer capítulo encontramos que los genes MtARF2, MtARF3, MtARF4a/b actúan como un módulo de regulación positivo en el crecimiento de las raíces y en el establecimiento de la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno. Se han reportado componentes en común entre la nodulación y el desarrollo de las raíces laterales, principalmente aquellos mecanismos modulados por auxinas del cual se desprende la propuesta de que el proceso de nodulación emergió a partir de programas moleculares preexistentes del desarrollo de las raíces laterales (Desbrosses and Stougaard, 2011). También hemos demostrado que la expresión de MtARF2, MtARF3 y MtARF4/b se activó en respuesta al Factor Nod, y que esta activación requiere del receptor NFP y del factor de transcripción NF-YA1, lo que sugiere que este conjunto de ARFs podría actuar aguas debajo del factor heterotrimérico NF-Y en la vía de señalización del factor Nod. Por otro lado, hemos encontrado que MtARF2, MtARF3 y MtARF4/b son necesarios para la inducción completa de MtNSP2 en respuesta a S. meliloti, sugiriendo que estos ARF podrían interceptar la vía de señalización de Factor Nod a nivel de la activación transcripcional de MtNSP2. También se demostró que MtARF2 es capaz de unirse de manera directa a uno de los sitios ARE dentro del promotor de MtNSP2. En conjunto, los resultados obtenidos acerca de los factores de transcripción MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b apuntan a una función de estos miembros de la familia ARF como reguladores positivos de la nodulación y su conexión con la vía de señalización de la nodulación a nivel de los factores de transcripción de la familia GRAS MtNSP1 y MtNSP2, lo cual representa un paso más hacia la dilucidación de los mecanismos moleculares que gobiernan la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

El análisis *in silico* de los cambios en el transcriptoma desencadenados por la activación de la vía miR390/*TAS3* presentado en el capítulo 2 identificó al gen *MtLBD17/29a*, un miembro de la familia de factores de transcripción LBD, el cual aumenta su abundancia en respuesta al rizobio en raíces EV, pero no en las raíces OX390. El análisis filogenético de los miembros LBD de *M. truncatula* indicó que MtLBD17/29a (*MtrunA17Chr1g0184271*) pertenece al Clado IB, los miembros de este clado fueron implicados en el desarrollo de órganos laterales de la raíz. Hemos evidenciado que el promotor de *MtLBD17/29a* se expresa en el meristema de las raíces

principales y laterales en *M. truncatula*, así como también en las células de nódulo que no han sido infectadas por el rizobio. Estos resultados son coincidentes con la expresión observada previamente para los genes *MIR390a* y *MIR390b* y los genes *MtARF3 y MtARF4a* (Hobecker et al., 2017; Kirolinko et al., 2021).

En el capítulo 3 pudimos caracterizar a nivel genético-funcional al gen *MtLBD17/29a*, el cual actuaría como regulador positivo de la elongación de las raíces principales y laterales al igual que lo observado previamente para los miembros MtARF2, MtARF3 y MtARF4a/b de la familia ARF. En cuanto a la función de *MtLBD17/29a* en la simbiosis fijadora de nitrógeno, se observó que tanto la reducción como el incremento de los niveles de *MtLBD17/29a* afectan negativamente el número de nódulos y la infección por rizobio, sugiriendo que los niveles de este gen requieren una fina regulación durante el establecimiento de la simbiosis. También verificamos que *MtLBD17/29a* es necesario para la inducción completa de *MtNSP2* en respuesta a *S. meliloti*. Estos resultados nos permiten concluir que la alteración de los niveles de *MtLBD17/29a* afecta directa o indirectamente la expresión de *MtNSP1 y MtNSP2*.

En conjunto, nuestros resultados permiten concluir que los miembros MtARF2, MtARF3, MtARF4a y MtARF4b de la familia ARF y MtLBD17/29a de la familia LBD constituyen componentes cruciales de los programas morfogenéticos que controlan el desarrollo de las raíces y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. El conocimiento generando podría ser trasladado en un futuro al desarrollo de programas biotecnológicos que permitan manipular y optimizar la captura de agua y nutrientes, y contribuir así al mejoramiento de los cultivos de leguminosas de importancia agronómica.

# Materiales y métodos

"Las palabras son, en mí no tan humilde opinión, nuestra más inagotable fuente de magia, capaces de infringir daño y de remediarlo"

Harry Potter de J. K. Rowling.

#### 1. Material biológico

Las semillas de *M. truncatula* Jemalong A17 fueron obtenidas del INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Montpellier, Francia. Las líneas mutantes de *M. truncatula* por inserción con transposones *tnt-1* en el gen *arf4a* fueron obtenidas de la colección disponible en The Samuel Robert Noble Foundations (Tadege et al., 2008). Las plantas mutantes de *M. truncatula skl, ern1, nin, nf-ya1* y *nfp* fueron cedidas gentilmente por el laboratorio del Dr. Andreas Niebel (Toulouse, Francia) en el marco de una colaboración internacional.

La cepa de *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 utilizada para la transformación de raíces de *M. truncatula* (Quandt et al., 1993) fue obtenida del VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie), University of Ghent, Bélgica. Para la inoculación de las raíces de *M. truncatula* se utilizó la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* (Breakspear et al., 2014; Meade et al., 1977) o la misma cepa marcada con la proteína roja fluorescente RFP (Tian et al., 2012). Las cepas DH5 $\alpha$  y TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de *Escherichia coli* fueron utilizadas para la transformación de vectores plasmídicos. La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía, fueron suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 % (v/v). Las suspensiones de bacterias fueron congeladas a -80 °C y preservadas a esa temperatura.

#### 2. Vectores de clonado

-**pENTR/D-TOPO** (Invitrogen). Vector de entrada 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-GAT.** Vector compatible con el sistema GATEWAY, utilizado para la expresión de proteínas. Contiene un epitope dual HIS- FLAG en su N-terminal (Zanetti et al., 2010). El plásmido posee el gen *Cmr*, que confiere resistencia a cloranfenicol para su selección en bacterias.

-**pK7WG2D,1**: Vector compatible con el sistema GATEWAY, utilizado para la expresión de proteínas (Karimi et al., 2002). El ORF se encuentra bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). El plásmido posee el gen *Sm/SpR* que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen *KanR*, bajo el promotor *nos* (*nopalina sintasa*). Además, posee el gen de la proteína verde fluorescente GFP bajo el promotor del gen

*rolD* como marcador reportero para visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopía de fluorescencia.

-**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 que codifica la proteína verde fluorescente GFP bajo el control del promotor *rolD* como gen reportero, lo que permite visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopia de fluorescencia.

-**pKGWFS7, 0**. Vector compatible con el sistema GATEWAY para la fusión transcripcional de promotores al gen reportero que codifica la proteína β-glucuronidasa (GUS) y al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (Karimi et al., 2002): El plásmido posee el gen *Sm/SpR* que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen *KanR*, bajo el promotor *nos* (*nopalina sintasa*), para su selección en plantas.

#### 3. Medios de cultivo

A continuación, se detallan los medios utilizados para el crecimiento de los microorganismos -Medio LB (Luria-Bertani): Para el crecimiento de las cepas de *E. coli* DH5 y TOP10 y *A. rhizogenes* Arqua I se utilizó el medio LB con la siguiente composición:

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
PH final	7,2

En los casos en que se utilizó medio sólido se agregó agar a una concentración final de 15 g/l.

-Medio TY: Para el crecimiento de las cepas de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* RFP se utilizó el medio TY, con la siguiente composición:

Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O0,	6 g/l

En los casos en que se utilizó medio sólido se agregó agar a una concentración final de 15 g/l.

-Medio Fahraeus: Para el crecimiento de M. truncatula se utilizó el medio Fahraeus (Fahraeus, 1957) con la siguiente composición:

Macronutrientes:	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O114 mg	g/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O120 n	ng/l
	Citrato Férrico5 n	ng/l
	KH2PO4100 mg	g/I
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 150 m	ıg/l
Microelementos		

•

KCI	3,73 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,55 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,85mg/l
CuSO4.5H2O	0,13mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,58 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,018mg/l

En los casos que se utilizó medio Fahraeus suplementado con NO3<sup>-</sup> se adicionó KNO3 a una concentración final de 8 mM. En los casos que se utilizó medio solido se agregó agar a una concentración final de 10 g/l.

#### -Antibióticos

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

	E. coli	A. rhizogenes	S. meliloti 1021	S. meliloti RFP	M. truncatula
Kanamicina	50 µg/ml	-	-	-	12,5 μg/ml
Espectinomicina	50 µg/ml	200 µg/ml	-	-	-
Estreptomicina	-	-	200 µg/ml	200 µg/ml	-
Cloranfenicol	35 µg/ml	200 µg/ml	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	5	-

#### 4. Clonado y transformación de DNA plasmídico

#### 4.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Mastercycler gradient (*Eppendorf*) en un volumen final de 20 µl. La composición de la mezcla de reacción cuando se utilizó la enzima Taq polimerasa (Productos Bio-Lógicos) fue la siguiente: buffer de reacción 1X, MgSO4 1,5 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,25 µM, y enzima Taq Polimerasa 0,5 U, con una concentración de templado variable. El tiempo de elongación, el número de ciclos y la temperatura de apareamiento utilizados fue variable para cada reacción realizada. Se utilizaron 25 o 35 ciclos de amplificación y en caso de amplifiación de regiones promotoras a partir de gDNA se utilizaron 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo se inició con 30 seg a 95 °C. La temperatura de annealing se eligió 5 °C por debajo de la temperatura de melting de los *primers*. El ciclo se completó con una incubación a 72 °C durante 1 minuto por kpb. Al finalizar se mantuvo a 72 °C durante 5 min para la etapa de elongación final. Como molde de la reacción se utilizaron células, plásmidos, gDNA o cDNA, dependiendo del caso.

Para la amplificación de fragmentos utilizados en los clonados se utilizó la enzima polimerasa Pfu (PB-L Productos Bio-Lógicos) o la enzima Phusion (New England BioLabs). Estas enzimas posees actividad exonucleasa 3' a 5', lo cual permite la corrección de errores en la amplificación (*proofreading*) y remueve las adeninas terminales. Se utilizaron las condiciones indicadas por los proveedores de la enzima.

#### 4.2 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA, RNA y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 0, 8 % a 1,2 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados. Para separar y visualizar los fragmentos, la agarosa se disolvió en TBE 0,5X (Tris base 0,045 M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,045 M, EDTA 0, 5 Mm, pH 7,2) y se agregó bromuro de etidio (BrEt) para visualizar las bandas. Las muestras de RNA o DNA se mezclaron en una relación 1:5 con buffer de siembra 6X (buffer Tris-HCl20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromo fenol 1 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en buffer TBE 0,5X a voltaje constante, usando 10 V por cada cm lineal de gel. Las bandas correspondientes a RNA o DNA se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV y se capturaron imágenes con un sistema de documentación de geles UVIdoc HD5 (Uvitec Cambrigde).

#### 4.3 Clonado en pENTR/D-TOPO

El clonado de fragmentos de PCR se realizó en el plásmido pENTR/D-TOPO siguiendo el protocolo detallado por el fabricante (Invitrogen). Brevemente, se puso en contacto 1-5 ng del fragmento amplificado con 15-20 ng/µL del vector linealizado pENTR/D-TOPO agregando1 µl de solución salina. Este volumen se incubó a 23 °C durante toda la noche y se utilizó para transformar bacterias competentes TOP10 (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a 37 °C por 24 horas en medio agar LB conteniendo kanamicina 50 mg/l para la selección del plásmido.

4.4 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)

Se realizó la recombinación sitio específica siguiendo los pasos indicados por el fabricante (Thermo Fisher). Se mezclaron 1  $\mu$ l vector pENTR con el inserto de interes, el buffer suministrado por el fabricante y 1  $\mu$ l del vector de destino pK7GWIWG2(II), el vector pKGWFS7, el vector pK7WG2D,1 o el vector p35S:HF-GAT (100 ng/ $\mu$ l) con 1  $\mu$ l la enzima LR clonasa. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 25 °C. Luego de este paso se adicionó 1  $\mu$ l de proteínasa K para inactivar la enzima y se incubó 10 min a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente se seleccionaron las transformantes mediante la selección en medio LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en el vector. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las colonias obtenidas se analizaron mediante *colony*-PCR o mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos aislados.

#### 4.5 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.

#### 4.6 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión con enzimas de restricción consistieron en una mezcla de reacción que incluye agua libre de nucleasas, el buffer de reacción 1X recomendado para cada enzima, 0,5-1 µg de DNA plasmídico y 2-5 unidades (UE) de la enzima de restricción. La mezcla de reacción se incubó durante 1-2 h a la temperatura óptima de la enzima de restricción utilizada en cada caso. Finalizada la incubación se verificó la digestión por electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.7 Transformación de células de E. coli TOP10 electro-competentes

Una suspensión de 100 μl de las células electro-competentes se mezcló con 1 μl de plásmido, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación previamente enfriada a -20 °C y se incubó en hielo por 2 min. Luego, se realizó un pulso de 2,2 kV/400Ω/25μF con un electroporador Gene Pulser (BioRad, Hércules, CA, USA). Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB. La mezcla se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) durante una hora. Las células se plaquearon en medio LB-agar con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las colonias obtenidas se analizaron mediante *colony* PCR.

#### 4.8 Transformación de células de A. rhizogenes mediante electroporación

Los vectores utilizados fueron introducidos en *A. rhizogenes Arqua* 1 mediante electroporación. Se utilizaron cubetas de electroporación de un espesor de 2 mm mantenidas a -20 °C. Un µl de plásmido se mezcló con 40 µl de células de *A. rhizogenes* electrocompetentes, mantenidas en hielo. Luego se transfirió la mezcla a la cubeta y se aplicó produjo un pulso de 1,8 kV/200U/25 µFD con un electroporador BioRad Gene Pulser. Inmediatamente se agregó 1 ml de LB y se transfirió a un tubo de cultivo estéril. Se incubó con agitación a 28 °C por una hora y luego se plaqueó en medio LB agar suplementado con 200µg/ml de espectinomicina o cloranfenicol según correspondía. Las colonias obtenidas se analizaron mediante *colony* PCR.

#### 4.9 Minipreparación de DNA plasmídico

A partir de una colonia bacteriana se inocularon 5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico correspondiente al plásmido de interés. Luego el cultivo fue incubado a 37 ºC con agitación durante aproximadamente 24 horas y se obtuvo un precipitado de células por centrifugación a

6000 g durante 10 min. A partir del precipitado se procedió a la minipreparación de DNA plasmídico mediante la utilización del kit comercial Miniprep Puro Plásmido (PB-L productos Biologicos) siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 5. Crecimiento de *M. truncatula* y generación de plantas compuestas

#### 5.1 Esterilización superficial y germinación de semillas de M.truncatula

Las semillas se escarificaron (bajo campana) con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido. Se realizaron ciclos de agitación de 30 seg seguidos de 30 seg en reposo hasta observar la aparición de puntos negros en las semillas (aproximadamente 5 por semilla). Luego se removió cuidadosamente el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido y se lavó con agua fría al menos 3 veces. Para la esterilización (bajo el flujo laminar) se utilizó hipoclorito de sodio 12 g/l durante 2 min, seguido de 5 o 6 lavados con agua estéril. Las semillas se transfirieron con una pinza estéril a placas de petri conteniendo agar-H<sub>2</sub>O a una concentración de 8 g/l. Se sembraron hasta 50 semillas por placa de petri. Para sincronizar la germinación de las semillas las placas se incubaron en posición invertida a 4 °C durante 2 días en oscuridad. Luego, las placas de petri se transfirieron a 25 °C y se mantuvieron invertidas en oscuridad para promover la germinación y producción de radículas rectas. Al cabo de aproximadamente 30 horas se obtuvieron radículas con una longitud de 10 mm y se utilizaron para la transferencia a medios de cultivo o para la transformación con *A. rhizogenes*.

#### 5.2 Método de transformación de raíces de M. truncatula

La transformación de las raíces se realizó de acuerdo con el protocolo descripto en la literatura (Boisson-Dernier et al., 2001). Las cepas de *A. rhizogenes Arqua* 1 transformadas con la construcción deseada fueron crecidas y seleccionados en medio LB-agar conteniendo el antibiótico adecuado para la selección del plásmido binario. Luego de la germinación de las semillas hasta la emergencia de una radícula de aproximadamente 10 mm, trabajando siempre en condiciones de esterilidad, se realizó un corte en la radícula a una distancia de 3 mm de la punta de la radícula y se inoculó la región seccionada con el cultivo en placa de *A. rhizogenes*. La selección de las raíces transgénicas se realizó en placas de Petri redondas (9 cm de diámetro) conteniendo medio Fahraeus inclinado suplementado con KNO<sub>3</sub> 8mM y kanamicina 15 mg/ml ml o 25mg/ml dependiendo del plásmido. El agar de las placas se seccionó de tal manera que

las raíces estuvieron en contacto con el medio con el antibiótico para la selección de aquellas raices que adquirieron el T-DNA, mientras que la parte aérea no transformada no estuvo en contacto con el medio.

Las plántulas fueron incubadas durante dos semanas en una cámara de cultivo Sanyo MLR-351HT a 25 °C, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad a 25 °C. 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 agar-Fahraeus con o sin KNO<sub>3</sub> y papel estéril sobre medio para que las raíces crezcan sobre la superficie del papel. Las plantas transformadas se incubaron en las condiciones de crecimiento descriptas anteriormente.

#### 6. Ensayos de nodulación

#### 6.1 Inoculación de las plantas con S. meliloti

Las plantas compuestas se transfirieron a cajas cuadradas de acrílico (dimensiones: 12 cm x 12 cm x 1 cm) conteniendo agar-Fahraeus inclinado sin KNO<sub>3</sub>. Se colocó un papel sobre el medio y se ubicaron seis plantas por caja. En el caso de plantas WT o mutantes, las plántulas con una radícula de aproximadamente 10 mm fueron transferidas a las cajas cuadradas conteniendo agar-Fahraeus inclinado sin KNO<sub>3</sub>. Las plantas se incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y a 80 % de humedad. La inoculación de las raíces de *M. truncatula* con su par simbiótico *S. meliloti* se llevó a cabo utilizando el protocolo reportado anteriormente (Journet et al., 2006). Brevemente, a los 7 días de transferidas a medio sin KNO<sub>3</sub> un grupo de estas plantas fueron inoculadas con 10 ml por caja de una suspensión de *S. meliloti* (cepa 1021 o cepa 1021 marcada con la proteína roja fluorescente RFP según corresponda) en agua estéril a una concentración de 5x10<sup>5</sup> bacterias/ml. Otro grupo de plantas fue inoculado con agua estéril como control (*mock*). Las cajas se mantuvieron 1 hora en posición horizontal, luego se retiró el exceso de suspensión bacteriana o agua, se transfirieron a la cámara de cultivo y se incubaron en posición vertical en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

#### 6.2 Cuantificación del número de nódulos

La cuantificación del número de nódulos se realizó al cabo de 7, 11, 14, 17 y 21 días postinoculación (dpi) visualizando los nódulos con una lupa en un transiluminador de luz blanca. Se contaron los nódulos formados por cada raíz, dado que en el método de transformación utilizado cada raíz transgénica representa un evento de transformación independiente. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

#### 6.3 Observación y cuantificación de hilos de infección

La observación y cuantificación de hilos de infección (ITs) de las plantas se realizó a los 7 dpi con la cepa 1021 de *S. meliloti* 1021 marcada con la proteína roja fluorescente RFP (Tian et al., 2012). Los eventos de infección se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS IX51. Se determinó el número de ITs por centímetro de raíz, así como también la progresión cuantificando el número de microcolonias, ITs en el pelo radical, que alcanzaron la base de la célula epidérmica y aquellos que alcanzaron las células corticales. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

#### 6.4 Determinación del peso seco de la parte aérea y de raíz

#### 6.4.1 Determinación del peso seco de la parte aérea y de raíz en plantas inoculadas

Para determinar el peso seco de la parte aérea y de la raíz las plantas se crecieron en cajas cuadradas de acrílico (dimensiones: 12 cm x 12 cm x 1 cm) 21 días, las plantas fueron inocularon con *S. meliloti* 1021. Se tomó el tejido aéreo y el de la raíz correspondiente a cada planta y por separado se envolvió en papel aluminio. Cada muestra se colocó en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante (aproximadamente por 48 horas). El peso se determinó utilizando una balanza analítica. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6.

### 6.4.2 Determinación del peso seco de la parte aérea y de raíz en plantas crecidas con y sin nitrógeno

Para determinar el peso seco de la parte aérea y de la raíz las plantas se crecieron en cajas cuadradas de acrílico durante 7 o15 o 21 días, y se hicieron crecer en medio con nitrógeno o sin nitrógeno, según correspondía. Se tomó el tejido aéreo y el de la raíz correspondiente a cada planta y por separado se envolvió en papel aluminio. Cada muestra se colocó en una estufa a 80

<sup>o</sup>C hasta obtener un peso constante (aproximadamente por 48 horas). El peso se determinó utilizando una balanza analítica. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6.

#### 6.5 Determinación del número de hojas o la longitud de la parte aérea

Para determinar la longitud de la parte aérea las plantas se crecieron en cajas cuadradas de acrílico durante 7 días en el caso de las plantas mutantes *arf4a* y 15 días en las plantas transgénicas. También se determinó el número de hojas verdaderas de los mutantes WT y arf4a a los 7 y 15 días.

#### 6.6 Recolección de tejidos

La recolección del tejido de raíces se realizó a partir de las plantas compuestas, WT o mutantes crecidas en placas cuadradas e inoculadas con *S. meliloti* (Sm) o con agua como control (*mock*). El tejido se colectó en  $N_2$  líquido y se pulverizó en mortero previniendo en todo momento que el tejido se descongele para evitar la acción de RNAsas. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

#### 6.7 Análisis de la arquitectura de raíz

Se crecieron las plantas compuestas, mutantes o WT en placas cuadradas de acrílico conteniendo medio Fahraeus suplementado con 8 mM KNO<sub>3</sub> o sin suplementar. Luego de 15 días, se cuantificó manualmente la longitud de las raíces laterales y las raíces principales emergidas. Adicionalmente, se calculó la densidad de raíces laterales como el número de raíces laterales emergidas por longitud de raíz principal. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6.

#### 6.8 Sensibilidad de las raíces compuestas a auxinas

Para evaluar la sensibilidad a auxinas de las raíces WT, mutantes o transformadas, se traspasaron las plantas compuestas a placas cuadradas conteniendo medio Fahraeus suplementado con 8 mM KNO<sub>3</sub> y con o sin ácido indolacético (IAA) 10 μM. A los 15 días se cuantificó el crecimiento de la raíz principal como la diferencia de la longitud de la raíz principal crecidas en presencia o ausencia de IAA con respecto a la longitud de las raíz principal cuando se traspasaron al medio Fahraeus suplementado. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6.

#### 7. Métodos de extracción de ácidos nucleicos

#### 7.1 Extracción de RNA

A partir de las muestras de tejidos colectados y almacenados a -80 ºC se realizaron las extracciones de RNA total utilizando Trizol (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo provisto por el proveedor, el cual consiste en 5 pasos:

- 1 Homogeneización: se agregaron 800 μl de reactivo Trizol por cada 50-100 mg de tejido (aproximadamente 3 puntas de espátula previamente enfriada en N<sub>2</sub> líquido). La mezcla se agitó 15 seg en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 2 Separación de fases: se agregaron 200 µl de cloroformo bajo campana y se agitó vigorosamente durante 15 seg en vórtex. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min, luego se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 4 °C. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una acuosa que contiene el RNA, y otra orgánica, donde se encuentran las proteínas. En la interface permanece el DNA. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo evitando tomar interface.
- 3 Precipitación de RNA: se agregó un volumen de isopropanol igual al volumen de la fase acuosa obtenida. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12,000 g durante 8 min a 4 ºC, obteniéndose un precipitado de color blanco.
- 4 Lavado de RNA: se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 800 μl de etanol (EtOH) 70 % (v/v) para eliminar las sales. Luego se centrifugó a 12,000 g durante 5 min a 4 ºC. Se descartó el sobrenadante de EtOH 70 % (v/v) y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min.
- 5 Solubilización de RNA: El precitado de RNA se resuspendió en 50 μl de H<sub>2</sub>O miliQ. La solución se incubó durante 10 min a 55 °C en un baño seco para solubilizar el RNA y se almacenó a -80 °C.

#### 7.2 Cuantificación del RNA y digestión con DNAsa libre de RNAsa

Se estimó la concentración de RNA de la muestra a partir de la cuantificación de la absorbancia medida en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop 26 Technologies). Para eliminar el posible DNA

genómico (gDNA) contaminante en las muestras de RNA se realizó una digestión con DNAsa libre de RNAsa. Se digirió 1 µg de RNA con una unidad de la enzima RQ1 DNAsa libre de RNAsa (Promega), buffer 1X y H<sub>2</sub>O miliQ en un volumen final de 10 µl. Se incubó durante 60 min a 37  $^{\circ}$ C y luego se agregó 1.0 µl de la solución Stop (EGTA 20 mM, Promega) y se incubó durante 20 min a 65  $^{\circ}$ C para inactivar la enzima.

#### 7.3 Síntesis de cDNA

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA tratado con DNAsa libre de RNAsa. A cada muestra de RNA se le adicionó 1 µl de oligodT 500ng/µl, se incubó a 70 <sup>Q</sup>C durante 5 min para desnaturalizar el RNA y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 5 µl de buffer de reacción 5X M-MVL RT (Promega), 1,25 µl de dNTPs 10 mM y 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Promega), llevando a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. La síntesis de cDNA se realizó incubando durante 90 min a 42 <sup>Q</sup>C y posteriormente se inactivó la enzima incubando durante 20 min a 65 <sup>Q</sup>C. Finalmente se ajustó el volumen con agua estéril a un máximo de 200 µl final por reacción y se almacenó a -20 <sup>°</sup>C hasta su uso.

Para la reacción de PCR utilizada para verificar la digestión con DNAsa y la síntesis de cDNA se utilizaron *primers* correspondientes al gen de *Actina 11* (ACT) o *HISTONE 3 LIKE* (*HIS3L*) (Anexo 1). Los *primers* de ACT hibridan en exones contiguos separados por un intrón permitiendo detectar la presencia de cDNA y la ausencia de gDNA. Las muestras de RNA diluido sin RT y las de cDNA fueron sometidas a una reacción de PCR tal como se indica en la sección 4.1 de Materiales y Métodos.

#### 7.4 PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones para medir los niveles de acumulación de los transcriptos seleccionados se llevaron a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real CFX96 Real Time System C1000 Thermal Cycler, (Bio-Rad). Para la cuantificación de los transcriptos se utilizó una reacción que consistió en 2.5 µl de cDNA a cuantificar; 0.5 µl de cada primer (directo y reverso), 5 µl de *SYBER Green master mix* 2X (Bio-Rad), 1.5µl de agua estéril. Cada reacción se realizó siguiendo el siguiente programa de ciclado: una primera etapa a 95 °C durante 5 min, seguida de 45 ciclos de 23 seg a 95 °C, 30 seg a 54 °C y 20 seg a 72 °C. También se realizaron curvas de melting para cada producto de reacción al finalizar la corrida. La normalización de los datos fue realizada mediante la amplificación del transcripto *HISTONE 3 LIKE (HIS3L*) de *M. truncatula*. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

#### 8. ChIP-PCR

#### 8.1 Fijación y colección de tejido

El tejido de raíz de las plantas HF-ARF2 fue recolectado y sumergido en 25 ml de Buffer MC con 1 % (v/v) de formaldehído que permite la fijación de las interacciones DNA-proteína. Se aplicó vacío por 15 min, se mezcló el tejido por inversión del tubo, y se aplicó vacío por 15 min más. Para detener la fijación se agregaron 2,5 ml de glicina (1,25 M) y nuevamente se aplicó vacío por 2 min. El tejido fue lavado 3 veces con buffer MC (25 ml por lavado), secado en papel y luego se pulverizó en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C.

#### **Buffer MC**

Fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 NaCl 50 mM Sacarosa 0,1 M

#### 8.2 Aislamiento de núcleos y sonicación

Se transfirieron 5 g de tejido fijado a un tubo Falcon de 50 ml conteniendo 30 ml de Buffer 1. Se mezcló con vórtex y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se filtró la suspensión a través de una malla de 55 µm y se centrifugó a 2000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en 5 ml de Buffer 2. El homogenato fue centrifugado a 2000 g a 4 °C por 10 min. Nuevamente se removió el sobrenadante y se resuspendió en 300 µl de Buffer 2. Se agregaron 600 µl de Buffer 3 a un nuevo tubo y se agregó la solución obtenida anteriormente suavemente para evitar que se mezclen. Se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C por 2 min. Se removió el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de Buffer de Lisis de los núcleos. La sonicación fue realizada utilizando un sonicador Bioruptor plus (Diagenode). Se realizaron 6 pulsos de sonicación durante 30 seg (con el tubo en hielo) y una pausa de 30 seg para que se enfríe la muestra. Este ciclo de sonicación fue repetido 4 veces y luego se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante (*Input*) fue utilizado para las reacciones de inmunoprecipitación.

Buffer 2	Buffer 3	Buffer de Lisis de los
		núcleos
*Sacarosa 0,25 M *Tris-HCl 10 mM, pH 8 *MgCl2 2 mM *β-mercaptoetanol 5 nM *Triton 1 % (v/v) *Inhibidor de	*Sacarosa 1,7 M *Tris-HCl 10 mM, pH 8 *MgCl2 10 mM *β-mercaptoetanol 5 nM *Inhibidor de proteasas	*Tris-HCl 50 mM, pH 8 *EDTA 10 mM *SDS 0.1 % (p/v) *Inhibidor de proteasas
	Buffer 2 *Sacarosa 0,25 M *Tris-HCl 10 mM, pH 8 *MgCl2 2 mM *β-mercaptoetanol 5 nM *Triton 1 % (v/v) *Inhibidor de proteasas	Buffer 2Buffer 3*Sacarosa 0,25 M*Sacarosa 1,7 M*Tris-HCl 10 mM, pH*Tris-HCl 10 mM, pH88*MgCl2 2 mM*MgCl2 10 mM*β-mercaptoetanol 5nMnMnM*Triton 1 % (v/v)*Inhibidor de*Inhibidor deproteasas

8.3 Preparación de Dynabeads conjugadas a anti-FLAG o IgGs

50 µl de *Dynabeads* conjugadas a Proteína G (Thermo Fisher) fueron resuspendidas y alicuotadas en un tubo de 1,5 ml y luego fueron separadas utilizando magneto por 3 min. Se descartó el sobrenadante y las *Dynabeads*—Proteína G se lavaron 3 veces con 1 ml de Buffer de dilución de ChIP. Seguidamente se mezcló 1 µl del anticuerpo correspondiente (anti-FLAG o IgGs) con las *Dynabeads* en 1000 µl de buffer de dilución de ChIP y se incubaron 1 horas a temperatura ambiente. Las *Dynabeads*—Proteína G fueron separadas empleando un magneto y se descartó el sobrenadante. Luego las *Dynabeads*—Proteína G unidas al anticuerpo se lavaron 2 veces con 1 ml de Buffer de dilución de ChIP. Se agregó nuevamente 1 ml de Buffer de dilución de ChIP y se transfirieron las bolillas a un nuevo tubo.

Buffer de dilución de

ChIP

Tris-HCl 16,7 nM, pH 8; \*EDTA 1,2 mM \*NaCl 167 mM \*TRITON 1.1 % (v/v)
#### 8.4 Inmunoprecipitación

El sonicador se diluyó 1/10 en Buffer de dilución de ChIP y fue mezclado con las *Dynabeads*– Proteína G unidas a anti-FLAG o a IgGs. Se incubó toda la noche a 4 °C con agitación. Luego se separaron las *Dynabeads* unidas a los complejos de cromatina con magneto, y seguidamente se removió el sobrenadante. Se realizaron 5 lavados con 1 ml de Buffer de dilución de ChIP. Las Dynabeads unidas a los complejos de cromatina se resuspendieron en 500 µl de PK Buffer. Se adicionaron 2 µl de proteínasa K para revertir el entrecruzamiento DNA-proteínas y se incubaron 4 horas a 65 °C. Luego, las mezclas y 15 min a 95 °C para desnaturalizar las proteínas y liberar el DNA. Las muestras se centrifugaron brevemente para colectar el volumen en el fondo del tubo y luego se incubaron 3 min en hielo. Nuevamente se separaron las *Dynabeads* con magneto y se conservó el sobrenadante incubándolo toda la noche a -20 °C.

#### Buffer de dilución PK Buffer

### de ChIP

*Tris-HCl 16,7 nM, pH	*Tris-HCl 100 mM,
8	pH 7.4
*EDTA 1,2 mM	*EDTA 10 mM
*NaCl 167 mM	*NaCl 50 mM
*Triton 1,1 % (v/v)	

#### 8.5 Precipitación

Se purificó el DNA mediante extracción fenol cloroformo:alcohol:isoanilico 25:24:1. Se centrifugó a 12000 rpm 15 min a 4 °C, se tomó fase superior y se agregó 1 volumen de cloroformo, se volvió a centrifugar a 12000 rpm 15 min a 4 °C. Se tomó la fase superior y se agregó 1  $\mu$ l de glicogen, 10 % del volumen de AcNa (pH 5.2) y 2 volúmenes de EtOH, y se incubó a -80 °C 2 horas. Se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 30min para precipitar el DNA, se lavó con EtOH 70 % (v/v) y se volvió a centrifugar a 12000 rpm a 4 °C 5 min. Se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua MiliQ y se agregó 0.5  $\mu$ l de RNAsa A. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta que se realizaron las reacciones de qPCR. Para la cuantificación se utilizó una reacción que consistió en 1  $\mu$ l del DNA a cuantificar; 0.5  $\mu$ l de cada primer (directo y reverso), 5  $\mu$ l de *SYBER Green master mix* 2X (Bio-Rad), 3 $\mu$ l de agua estéril. Cada reacción se realizó siguiendo el siguiente programa de ciclado: una primera etapa a 95 °C durante 5 min, seguida de 45 ciclos de 23 seg a 95 °C, 30 seg a 54 °C y 20 seg a 72 °C.

### 8.6 Análisis de datos

En los experimentos de ChIP-PCR, las regiones de interés se cuantificaron mediante qPCR y se normalizaron utilizando un fragmento de cromatina del gen de ACT11 que no tiene regiones ARE como control. El enriquecimiento en veces se calculó normalizando el porcentaje del ChIP/Input obtenidas usando anti-FLAG con el porcentaje del ChIP/imput en muestras obtenidas usando anti-IgGs. Se realizaron dos réplicas técnicas.

## 9. Tinción y microscopía

### 9.1 Tinción histoquímica de GUS y microscopía de campo claro

Las tinciones histoquímicas de GUS de raíces y nódulos se llevaron a cabo según el protocolo descripto anteriormente (Jefferson et al., 1987). Para los cortes transversales de los nódulos y raíces principales *pMtLBD17/29a*, se embebieron las raíces en agarosa 6 % (p/v) y luego se realizaron cortes utilizando un vibratomo Leica VT1000 S (Leica Microsystems). Los tejidos fueron visualizados bajo luz blanca utilizando un microscopio invertido.

### 9.2 Tinción con SYTO9 e loduro de propidio

Se extrajeron nódulos individuales de plantas cultivadas en potes conteniendo perlita:arena (3:1) a 28 dpi con *S. meliloti* 1021. Se embebieron en agarosa y se cortaron secciones de nódulos de 60  $\mu$ m utilizando un Vibratome Leica VT1000 S (Leica Microsystems). La tinción de los nódulos se llevaron a cabo durante 30 min a temperatura ambiente utilizando SYTO9 5  $\mu$ M e ioduro de propidio 30  $\mu$ M. Las muestras se observaron en un microscopio confocal SP5 invertido (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron con el software LAS Image Analysis.

### 9.3 Microscopia de fluorescencia

La microscopía de epifluorescencia se realizó en raíces *pMtLBD17/29a* a los 7, 11 y 21 dpi con una cepa de *S. meliloti* que expresa RFP (Tian et al., 2012) en un microscopio OLYMPUS IX51. La microcopia confocal se realizó en un microscopio Leica SP5 (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).

## 10. Análisis estadístico

En los análisis estadísticos, los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6. Se calculó la media ± el desvio estándar y se determinó la significancia estadística de los datos mediante un t-test no apareado de dos colas. Se realizaron entre 2 y 4 réplicas biológicas por cada ensayo.

## 11. Análisis bioinformáticos generales

## 11.1 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/).

## 11.2 Bases de datos de secuencias genómicas

Se utilizaron las bases de datos genómicas de *M. truncatula* versión A17 r5.0 (Pecrix et al., 2018), (https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/) y de *A. thaliana The Arabidopsis Information Resource* disponible en <u>https://www.arabidopsis.org/</u>.

## 11.3 Base de datos de secuencias de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de *A. thaliana* se descargaron de la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* disponible en <u>https://www.arabidopsis.org/</u>. Las secuencias de aminoácidos de *M. truncatula* se descargaron de la base de datos MtrunA17r5.0-ARN disponible en <u>https://medicago.toulouse.inra.fr</u> (Pecrix et al., 2018).

## 11.4 Análisis filogenéticos

Fueron realizados con el programa MEGA-X (Kumar et al., 2018) a partir de los alineamientos múltiples obtenidos con Clustal Omega. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método neighbor-joining y la opción de bootstrap con 1000 repeticiones. Los árboles filogenéticos fueron diagramados en una escala definida por las distancias evolutivas con el programa MEGA-X.

#### 11.5 Análisis de sintenia

Los análisis de sintenia se realizaron utilizando el sitio https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\_v3\_dicots/synteny/index y los identificadores de gen de la versión Mt4.0 del genoma de *M. truncatula*, la cual se encuentra disponible en dicha base de datos.

#### 11.6 Base de datos de expresión utilizadas

Para analizar los perfiles de expresión de los genes de *M. truncatula* Se utilizaron la base de datos de microarreglos de The *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA) Project. *Noble Research Intitute legacy Gene Atlas V3 dataset* disponibles en <u>https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/expressionAtlas/app/mtgeav3/</u> (Benedito et al., 2008) y la base de datos *Medicago truncatula RNA-seq Gene Expression Atlas Project Published RNA-seq dataset Gene Atlas* disponible en disponibles en https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/expressionAtlas/app/v3/ (Carrere et al., 2021).

#### 11.7 Análisis de elementos regulatorios en promotores

Para análisis la presencia de elementos regulatorios en los promotores de los genes se utilizó el software gratuito *Plant cis-acting regulatory DNA elements* (PLACE) (https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgibin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace).

#### 11.8 Los análisis filogenéticos

Fueron realizados con el programa MEGA-X (Kumar et al., 2018) a partir de los alineamientos múltiples obtenidos con Clustal Omega. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método neighbor-joining y la opción de bootstrap con 1000 repeticiones. Los árboles filogenéticos fueron diagramados en una escala definida por las distancias evolutivas con el programa MEGA-X.

#### 11.9 Procesamiento y análisis de los datos de RNA-seq

El análisis informático fue llevado a cabo a través de la plataforma GALAXY (Blankenberg et al., 2010) El alineamiento de las lecturas de RNA-Seq al genoma de referencia *M. truncatula* versión v.5 (Pecrix et al., 2018) se realizó utilizando el algoritmo *HiSAT2* (Kim et al., 2019) y los archivos en formato fastq obtenidos durante la tesis doctoral de la Dra. Hobecker. Se cargó el genoma de referencia el formato Fasta y se le indicaron los siguientes parámetros:

Specify strand information	Unstranded
Output alignment summary in a more machine- friendly style.	False
Print alignment summary to a file.	True
Input options	defaults
Alignment options	defaults
Scoring options	defaults
Spliced alignment options	defaults
Reporting options	defaults
Output options	defaults
SAM options	defaults
Other options	defaults

Job Resource Parameters

A partir de los archivos salida en formato BAM generados y los datos del genoma *M. truncatula* versión v.5 (en formato gtf) se utilizó la herramienta *StringTie* (Pertea et al., 2015) para ensamblar y cuantificar los transcriptos completos que representan múltiples variantes de empalme para cada *locus* genómico. Se indicaron los siguientes parámetros:

Input Parameter	Value
Input options	short_reads
Input short mapped reads	HISAT2 en las muestras (BAM)
Specify strand information	Unstranded
Use a reference file to guide assembly?	yes
Reference file	history
GTF/GFF3 dataset to guide assembly	Genoma medicago v5.gtf
Use Reference transcripts only?	False
Output files for differential expression?	no
Output coverage fil?	False
Output gene abundance estimation file?	True
Do not assemble any transcripts on these reference sequence(s)	Empty.
Name prefix for output transcripts	Empty.
Minimum isoform fraction	0.15
Minimum assembled transcript length	200
Minimum anchor length for junctions	10
Minimum junction coverage	1
Minimum bundle reads per bp coverage to consider for assembly	2
Gap between read mappings triggering a new bundle	50
Fraction of bundle allowed to be covered by multi-hit reads	0.95
Disable trimming of predicted transcripts based on coverage	False
Disable multi-mapping correction	False
Input point-features dataset	
Job Resource Parameters	no

StringeTie generó archivos con los transcriptos ensamblados en formato *gtf* y una tabla con los datos de abundancia de los transcriptos en la unidad. Se fusionaron los archivos de *StringTie* para cada muestra mediante la herramienta *StringTie Merge*, generando una nueva tabla en formato *gtf*. A partir de esta nueva tabla y de los archivos BAM generados por *HiSAT2* se generaron tablas de "*genes counts*" utilizando *StringTie*. Se indicaron los siguientes parámetros:

Input Parameter	Value
Input options	short_reads
Input short mapped reads	HISAT2 aligned reads (BAM)
Specify strand information	Unstranded
Use a reference file to guide assembly?	yes
Reference file	history
GTF/GFF3 dataset to guide assembly	StringTie merge
Use Reference transcripts only?	True
Output files for differential expression?	deseq2
Specify the average read length	75
Cluster overlapping genes	False
Prefix used for transcripts	Empty.
Prefix for clustering	Empty.
Output coverage file?	True
Output gene abundance estimation file?	True
Do not assemble any transcripts on these reference sequence(s)	Empty.
Name prefix for output transcripts	Empty.
Minimum isoform fraction	0.15
Minimum assembled transcript length	200
Minimum anchor length for junctions	10
Minimum junction coverage	1
Minimum bundle reads per bp coverage to consider for assembly	2
Gap between read mappings triggering a new bundle	50
Fraction of bundle allowed to be covered by multi-hit reads	0.95
Disable trimming of predicted transcripts based on coverage	False
Disable multi-mapping correction	False
Input point-features dataset	

Posteriormente se utilizó la herramienta DEseq2 (Love et al., 2014), utilizando comandos en *Rstudio*, reteniendo sólo aquellos genes que presentaron valores de FMKP  $\geq$  1 en al menos una de las muestras analizadas. Se obtuvieron valores de Log<sub>2</sub>*FoldChange* (FC) de las FPKM y valores de probabilidad (*p*) para cada una de las comparaciones de a pares.

## 11.10 Heatmap

Los gráficos de heatmap representando los valores de Log<sub>2</sub>FC para los factores de transcripción diferenciales obtenidos de las comparaciones de a pares entre las muestras se realizó utilizando el programa *Morpheus* disponible en el portal <u>https://software.broadinstitute.org/morpheus</u>.10. Tinción histoquímica y microscopia

# ANEXOS

## Anexo 1: Primers

## Lista de primers utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Uso	Referencia
ARF2/3/4 RNAi F	CACCGGAGCGTCAGACTTTGGGG	clonado de RNAi	este trabajo
		dirigido a ARF2/3/4	
ARF2/3/4 RNAi R	CGTAGGGTGGGCACAGAAG	clonado de RNAi	este trabajo
	CACCECAACETCTEETATCAECE	dirigido a ARF2/3/4	osto trabaio
GUS KINAI F	CACCOCAACOTCTOGTATCAGCG	dirigido a GUS	
GUS RNAi R	CTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC	clonado de RNAi	este trabajo
		dirigido a GUS	
pLBD17/29a F	CACCATGGTTCATTGAGGAACAGTCTACTG	clonado de promotor	este trabajo
pLBD17/29a R	ACCAAAGGAAGAGGAAGGGTTG	clonado de promotor	este trabajo
ORF LBD 17/29 F	CACCATGGCTGGTTCTAGTTCTGTGT	clonado de ORF	este trabajo
ORF LBD 17/29 R	TCAACTGTATCCAAAAGCCACTGAATGTA	clonado de ORF	este trabajo
LBD17/29a RNAi (1) F	CACCATGGATCTAGACCCTATGAGGAAT	clonado RNAi dirigido LBD17/29a	este trabajo
LBD17/29a RNAi (1) R	AAGCCACTGAATGTAGGTCCT	clonado RNAi a dirigido I BD17/29a	este trabajo
LBD17/29a RNAi (2) F	CACCCACATGCACCATAGTCTATTGC	clonado RNAi dirigido	
		a LBD17/29a	
LBD17/29a RNAi (2) R	TCGGTGCTGCGTAATTTCTATGA	clonado RNAi dirigido	este trabajo
		LBD17/29a	
LBD17/290 F		qPCR apcR	este trabajo
			(Ariel et al., 2010)
HIS3L K		qPCR	(Ariel et al., 2010)
Act11 F	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG	qPCR	(Ariel et al., 2010)
Act11 R	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC	qPCR	(Ariel et al., 2010)
MtARF2 F	TCGTCAAAGTAAGCATGGGACC	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtARF2 R	CCATCTTTTCTTCATCAGTTGCAGGA	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtARF3 F	CACTTCAGCAAAGCTAGAATTTCCA	qPCR	( Reynoso et al., 2013)
MtARF3 R	TTTGAACCAGGATAGCACCTCCT	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtARF4a/b F	AGAAACGGTCTTCCTGAATCAAT	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtARF4a/b R	TCATTTTGAATCTTGTCCCTATGGT	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtARF4a F	TTGGTTCCCCAAGTCCCAA	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtARF4b R	ACCTTGCATCAACTGGAATAGG	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtARF16 F	TTCAAGACATCAAGGAACCTAGCT	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtARF16 R	TCATCAAAGGGTTTATTCAGTTGCAAG	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtARF19a F	CATCGAGTATTCACATTCTTCGGCA	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtARF19a R	ACCATTAAAAGCAGTGTGCGGA	qPCR	(Kirolinko et al, 2021)
MtERN1 F	GGAAGATGGTGCTGTTGCTT	qPCR	(Andriankaja et al, 2007)
MtERN1 R	TGTTGGATTGTGAACCTGACTC	qPCR	(Andriankaja et al, 2007)
MtNF-YA1 F	AAAATATGGCTATGCAACCTGTTA	qPCR	(Combier et at, 2006)

MtNF-YA1 R	CAACTGACATCTTACAATCATCTGG	qPCR	(Combier et at, 2006)
MtNSP2 F	GACACACTTGCTGCTTTCCA	qPCR	(Smit et al, 2006)
MtNSP2 R	AATGCGGTTATCCGAAGATG	qPCR	(Smit et al, 2006)
MtNFY-C1 F	CCTGTGATGGACCCAAACA	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtNFY-C1 R	CACCAATGGAACAGTTTCACC	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
MtNIN F	GAAGCCATGACTATCCGCGTC	qPCR	(Smit et al., 2007)
MtNIN R	CACCACAACCTGATGCACCAC	qPCR	(Smit et al., 2007)
MtENOD11 F	ATCCCACAATATGCCTCCA	qPCR	(Gonzales-Rizzo et al., 2006)
MtENOD11 R	AGGAAGTGGTGGCTTTAGCA	qPCR	(Gonzales-Rizzo et al. <i>,</i> 2006)
MtNSP1 F	GTGGTTAGAAAATCTGGTGGG	qPCR	(Smit et al, 2005)
MtNSP1 R	GTGTCAATGCTCGAAGACCA	qPCR	(Smit et al, 2005)
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	secuenciación pENTR/D-TOPO	Thermo Fisher
M13 R	CAGGAAACGGCTTGTCCCG	secuenciación pENTR/D-TOPO	Thermo Fisher
pK7WG2D, 1 F	GATGACGCACAATCCCACTATCC	secuenciación pK7WG2D, 1	este trabajo
pK7WG2D, 1 R	CGTAAAACGGCTTGTCCCG	secuenciación pK7WG2D, 1	este trabajo
pK7GWIWG2D (II) F	GATGACGCACAATCCCACTATCC	secuenciación pK7GWIWG2D (II)	(Blanco et al, 2009)
pK7GWIWG2D(II) R	CGTAAAACGGCTTGTCCCG	secuenciación pK7GWIWG2D (II)	(Blanco et al, 2009)
ChiP ARF4a F	CTCCACCCAACACACATACAC	qPCR	este trabajo
ChiP ARF4a R	GGGAGCAGAAGACAGAGACAA	qPCR	este trabajo
ChiP ARF4b F	ACATGATGTTGGGGAGACCG	qPCR	este trabajo
ChiP ARF4b R	CGTTGTCTCAAAGTCTCTTAATGGTTC	qPCR	este trabajo
ChiP ARF3 F	AAGCCTAACCAAGCCGATATCAAT	qPCR	este trabajo
ChiP ARF3 R	GGCATAGGCACATACCGACA	qPCR	este trabajo
ChiP LBD17/29a ARE1 f	ACGTCTATGCGTTTGGAATATCCAG	qPCR	este trabajo
ChiP LBD17/29a ARE1 R	CTTCTATTTTTGGTGAGGGCACATG	qPCR	este trabajo
ChiP LBD17/29a ARE2 F	ATGGTTCATTGAGGAACAGTCTACTG	qPCR	este trabajo
ChiP LBD17/29a ARE2 R	ACACGTATCGGATACAGAAACTTCAC	qPCR	este trabajo
ChiP NSP2 ARE1 F	CTCACCCTTGATTCTTAGTTCCATTATG	qPCR	este trabajo
ChiP NSP2 ARE1 R	TTCCATCTATCTTACCCAGC	qPCR	este trabajo
ChiP NSP2 ARE 2 F	ACAGCGCACATAACAATATTCCCT	qPCR	este trabajo
ChiP NSP2 ARE 2 R	GGGGTTGAGAGGTGATGGA	qPCR	este trabajo

# Anexo 2: Abreviaturas

AGO: argonauta
ATP: adenosina tri-fosfato
CaMV 35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
CCaMK: calcium and calmodulin-binding kinase
cDNA: DNA complementario
CRE: cytokin response element
DCL3: Dicer-like 3
DCP: decapping protein
DMI: gen does not make infections
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
dpi: días post-inoculación
dsRNA: RNA doble cadena
ENOD: Early Nodulin
ERF: Ethylene Response Factor
ERN: Ethylene Response Factor Required for Nodulation
EV: empty vector
FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno
FC: fold change
FPKM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
gDNA: DNA genómico
GED: gen expresado diferencialmente
GFP: green fluorescent protein
GO: gene ontology

GRAS: Giberellic acid-Insensitive (GAI), Repressor of GAI (RGA) and Scarecrow

GUS: β-glucuronidasa

HF: epitope dual His-FLAG

His: epitope de histidinas

HIS3L: HISTONE 3 LIKE

hpi: horas post-inoculación

IPD3: interacting protein of dmi3

IT: infection thread

JAS: jasmonate zim-domain protein

Kb: kilobase

LB: borde izquierdo del T-DNA

LRR: leucine rich repeat

miRNA: microRNA

mock: inoculación con agua

mRNA: RNA mensajero

NF: nod factor

NFP: nod factor perception

NF-Y: nuclear factor Y

NIN: nodule inception

NSP: nodule signalling pathway

nts: nucleótidos

ocs: octopina sintasa

ORF: open reading frame

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pre-mRNA: precursor de mRNA

PTE: polyoxoetilen-10-tridecil eter

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RB: borde derecho del T-DNA

RBP: RNA binding protein

RDR: RNA polimerasa dependiente de RNA

RFP: red fluorescent protein

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RNA-seq: secuenciación masiva de RNA

RR: reguladores de respuesta a citoquininas

RT: transcripción reversa

SEM: standard error of de mean

siRNA: small interfering RNA

TAS: transcripto no codificante del que derivan tasiRNAs

tasiRNA: trans acting small interfering RNA

T-DNA: DNA de transferencia de la planta

TF: factor de transcripción

TILLING: Target Induced Lessions in Genomes

tRNA: RNA de transferencia

uORF: marco abierto de lectura previo al ORF principal

UTR: untranslated region

UV: luz ultravioleta

## Anexo 3: Bibliografía

- Amor, B. Ben, Shaw, S. L., Oldroyd, G. E. D., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., ... Gough, C. (2003). The NFP locus of Medicago truncatula controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 34(4), 495–506. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01743.x
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G., & 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. *The Plant Cell*, 19(9), 2866–2885. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052944
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., & Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in Medicago truncatula requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *The Plant Cell*, 22(7), 2171–2183. https://doi.org/10.1105/tpc.110.074823
- Atkins, C. A., Pate, J. S., & Sharkey, P. J. (1975). Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiology*, *56*(6), 807–812. https://doi.org/10.1104/pp.56.6.807
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Goldstein, D.B., and Patel, N. H. (n.d.). *Evolution.(Cold Sring Harbor Press)*.
- Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Rípodas, C., Ariel, F., Frances, L., ... Niebel, A. (2015). A Phylogenetically Conserved Group of Nuclear Factor-Y Transcription Factors Interact to Control Nodulation in Legumes. *Plant Physiology*, 169(4), 2761 LP – 2773. Retrieved from http://www.plantphysiol.org/content/169/4/2761.abstract
- Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., ... Udvardi, M. K.
  (2008). A gene expression atlas of the model legume Medicago truncatula. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 55(3), 504–513. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 115(5), 591–602. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Bensmihen, S. (2015). Hormonal Control of Lateral Root and Nodule Development in Legumes. *Plants* (*Basel, Switzerland*), 4(3), 523–547. https://doi.org/10.3390/plants4030523
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., ... Taylor, J. (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19*, Unit 19.10.1-21. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1910s89
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001).
  Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogenfixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 14(6), 695–700. https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.695
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., ... Murray, J. D. (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(12), 4680–4701. https://doi.org/10.1105/tpc.114.133496
- Bustos-Sanmamed, P., Bazin, J., Hartmann, C., Crespi, M., & Lelandais-Brière, C. (2013). Small RNA pathways and diversity in model legumes: lessons from genomics. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 236. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00236

- Carrere, S., Verdier, J., & Gamas, P. (2021). MtExpress, a Comprehensive and Curated RNAseq-based Gene Expression Atlas for the Model Legume Medicago truncatula. *Plant and Cell Physiology*, *62*(9), 1494–1500. https://doi.org/10.1093/pcp/pcab110
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., ... Bennett, M. (2001). Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell*, *13*(4), 843–852. https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.843
- Castaingts, M., Kirolinko, C., Rivero, C., Artunian, J., Mancini Villagra, U., Blanco, F. A., & Zanetti, M. E. (2022). Identification of conserved and new miRNAs that affect nodulation and strain selectivity in the Phaseolus vulgaris–Rhizobium etli symbiosis through differential analysis of host small RNAs. New Phytologist, 234(4), 1430–1447. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.18055
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., & Davies, B. (2012). The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in Arabidopsis . *Plant Physiology*, *158*(1), 423–438. https://doi.org/10.1104/pp.111.186999
- Cerri, M. R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G. E. D., ... 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*(4), 2155– 2172. https://doi.org/10.1104/pp.112.203190
- Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F., & Barker, D. G. (2003). Efficient transformation of Medicago truncatula cv. Jemalong using the hypervirulent Agrobacterium tumefaciens strain AGL1. *Plant Cell Reports*, 22(1), 46–51. https://doi.org/10.1007/s00299-003-0649-y
- Chandler, J. W. (2016). Auxin response factors. *Plant, Cell & Environment, 39*(5), 1014–1028. https://doi.org/10.1111/pce.12662
- Charpentier, M., & Oldroyd, G. (2010). How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(5), 556–564. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.003
- Charpentier, M., Sun, J., Vaz Martins, T., Radhakrishnan, G. V, Findlay, K., Soumpourou, E., ... Oldroyd, G. E. D. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6289), 1102–1105. https://doi.org/10.1126/science.aae0109
- Chen, X., Wang, H., Li, J., Huang, H., & Xu, L. (2013). Quantitative control of ASYMMETRIC LEAVES2 expression is critical for leaf axial patterning in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 4895–4905.
- Cooper, J. B., & Long, S. R. (1994). Morphogenetic Rescue of Rhizobium meliloti Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *The Plant Cell*, *6*(2), 215 LP 225. Retrieved from http://www.plantcell.org/content/6/2/215.abstract
- Crespi, M., & Frugier, F. (2008). De Novo Organ Formation from Differentiated Cells: Root Nodule Organogenesis. *Science Signaling*, 1(49), re11 LP-re11. Retrieved from http://stke.sciencemag.org/content/1/49/re11.abstract
- D'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., & Ratet, P. (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *The Plant Journal*, *34*(1), 95–106. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01701.x
- De Smet, I., Lau, S., Voss, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E. H., ... Beeckman, T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2705–2710. https://doi.org/10.1073/pnas.0915001107
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F. dit, Laplaze, L., Casimiro, I., ... Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*, 134(4), 681–690. https://doi.org/10.1242/dev.02753

- De Smet, I., Vanneste, S., Inzé, D., & Beeckman, T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology*, 60(6), 871–887. https://doi.org/10.1007/s11103-005-4547-2
- Douglas, R. N., Wiley, D., Sarkar, A., Springer, N., Timmermans, M. C. P., & Scanlon, M. J. (2010). ragged seedling2 Encodes an ARGONAUTE7-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsiventrality, of maize leaves. *The Plant Cell*, 22(5), 1441–1451. https://doi.org/10.1105/tpc.109.071613
- Dubrovsky, J G, Doerner, P. W., Colón-Carmona, A., & Rost, T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *124*(4), 1648–1657. https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1648
- Dubrovsky, Joseph G, Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M. G., ... Benková, E. (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *The New Phytologist*, *191*(4), 970–983. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03757.x
- Dubrovsky, Joseph G, Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., ... Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25), 8790–8794. https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105
- Ehrhardt, D. W., Wais, R., & Long, S. R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell*, *85*(5), 673–681.
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., & Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)*, *132*(20), 4563–4574. https://doi.org/10.1242/dev.02012
- Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1, 636. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/ngeo325
- FAHRAEUS, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology*, *16*(2), 374–381. https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. https://doi.org/10.2307/2408678
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C. P., & Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF Gene Family in Land Plants: Old Domains, New Tricks. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 45–56. https://doi.org/10.1093/molbev/mss220
- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., ... Considine, M. J. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2, 16112. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.112
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J. D., Crespi, M., & Szczyglowski, K. (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science*, 13(3), 115–120. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.003
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., & Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-offunction mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell* and Molecular Biology, 29(2), 153–168. https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., & 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 Physiology*, *137*(4), 1228 LP 1235. Retrieved from http://www.plantphysiol.org/content/137/4/1228.abstract
- Gilroy, S., & Jones, D. L. (2000). Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science*, *5*(2), 56–60. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-

1385(99)01551-4

- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D. M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., ... Guyomarc'h, S. (2016).
  Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development*, *143*(18), 3363–3371. https://doi.org/10.1242/dev.135319
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. (2006). The <em&gt;Medicago truncatula&lt;/em&gt; CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with <em&gt;Sinorhizobium meliloti&lt;/em&gt; The Plant Cell, 18(10), 2680 LP – 2693. Retrieved from http://www.plantcell.org/content/18/10/2680.abstract
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877. https://doi.org/10.1104/pp.017004
- Guo, M., Thomas, J., Collins, G., & Timmermans, M. C. P. (2008). Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(1), 48–58.
- Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, *49*(3–4), 373–385.
- He, F., Xu, C., Fu, X., Shen, Y., Guo, L., Leng, M., & Luo, K. (2018). The MicroRNA390/TRANS-ACTING SHORT INTERFERING RNA3 Module Mediates Lateral Root Growth under Salt Stress via the Auxin Pathway. *Plant Physiology*, 177(2), 775–791. https://doi.org/10.1104/pp.17.01559
- Heckmann, A. B., Sandal, N., Bek, A. S., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M. W., ... Stougaard, J. (2011). Cytokinin induction of root nodule primordia in Lotus japonicus is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 24(11), 1385–1395. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0142
- Heidstra, R., & Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(5), 301–312. https://doi.org/10.1038/nrm3790
- Held, M., Hossain, M. S., Yokota, K., Bonfante, P., Stougaard, J., & Szczyglowski, K. (2010). Common and not so common symbiotic entry. *Trends in Plant Science*, 15(10), 540–545. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.001
- Herrbach, V., Remblière, C., Gough, C., & Bensmihen, S. (2014). Lateral root formation and patterning in Medicago truncatula. *Journal of Plant Physiology*, 171(3), 301–310. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.006
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., & Beeckman, T. (2002). Auxinmediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell*, 14(10), 2339–2351. https://doi.org/10.1105/tpc.004960
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. D. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in Medicago truncatula. *The Plant Cell*, *21*(2), 545–557. https://doi.org/10.1105/tpc.108.064501
- Hobecker, K. V., Reynoso, M. A., Bustos Sanmamed, P., Wen, J., Mysore, K. S., Crespi, M., ... Zanetti, M. E. (2017). The microRNA390/TAS3 pathway mediates in symbiotic nodulation and lateral root growth. *Plant Physiology*. Retrieved from http://www.plantphysiol.org/content/early/2017/06/29/pp.17.00464.abstract
- Hofer, J. M. I., & Noel Ellis, T. H. (2014). Developmental specialisations in the legume family. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*, 153–158. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.014
- Howarth, R. W., Boyer, E. W., Pabich, W. J., & Galloway, J. N. (2002). Nitrogen Use in the United States from 1961-2000 and Potential Future Trends. *Ambio*, 31(2), 88–96. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/4315220

Husbands, A., Bell, E. M., Shuai, B., Smith, H. M. S., & Springer, P. S. (2007). LATERAL ORGAN

BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic Acids Research*, *35*(19), 6663–6671. https://doi.org/10.1093/nar/gkm775

Ishikawa, H., & Evans, M. L. (1995). Specialized Zones of Development in Roots. In Plant Physiology.

- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., & Dubrovsky, J. G. (2008). Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 55(2), 335–347. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., ... Machida, C. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant and Cell Physiology*, 43(5), 467–478.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Li, Y.-F., Shukla, L. I., Matts, J., Hoyt, P., ... Sunkar, R. (2009). Cloning and characterization of small RNAs from Medicago truncatula reveals four novel legume-specific microRNA families. *The New Phytologist*, *184*(1), 85–98. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02915.x
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x
- Jhu, M.-Y., & Oldroyd, G. E. D. (2023). Dancing to a different tune, can we switch from chemical to biological nitrogen fixation for sustainable food security? *PLOS Biology*, *21*(3), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001982
- Journet, E. P., de Carvalho-Niebel, F., Andriankaja, A., Huguet, T., & Barker, D. G. (2006). Rhizobial inoculation and nodulation of Medicago truncatula.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., ... Oldroyd, G. E. D. (2005).
  Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science (New York, N.Y.), 308*(5729), 1786–1789. https://doi.org/10.1126/science.1110951
- Karimi, M., Depicker, A., & Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1144–1154. https://doi.org/10.1104/pp.107.106989
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY<sup>™</sup> vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3
- Kawaharada, Y., Nielsen, M., Kelly, S., James, E., Andersen, K., Rasmussen, S., ... Stougaard, J. (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nature Communications*, 8. https://doi.org/10.1038/ncomms14534
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4
- Kirolinko, C., Hobecker, K., Wen, J., Mysore, K. S., Niebel, A., Blanco, F. A., & Zanetti, M. E. (2021). Auxin Response Factor 2 (ARF2), ARF3, and ARF4 Mediate Both Lateral Root and Nitrogen Fixing Nodule Development in Medicago truncatula . *Frontiers in Plant Science*. Retrieved from https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.659061
- Kohlen, W., Ng, J. L. P., Deinum, E. E., & Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 229–244. https://doi.org/10.1093/jxb/erx308

Kondorosi, E., & Kondorosi, A. (2004). Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting

complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters*, *567*(1), 152–157. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.075

- Korasick, D. A., Westfall, C. S., Lee, S. G., Nanao, M. H., Dumas, R., Hagen, G., ... Strader, L. C. (2014). Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5427–5432. https://doi.org/10.1073/pnas.1400074111
- Kornet, N., & Scheres, B. (2009). Members of the GCN5 histone acetyltransferase complex regulate PLETHORA-mediated root stem cell niche maintenance and transit amplifying cell proliferation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(4), 1070–1079. https://doi.org/10.1105/tpc.108.065300
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
- Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M. R., ... Niebel, A. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legumerhizobia endosymbiosis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *79*(5), 757–768. https://doi.org/10.1111/tpj.12587
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., ... Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19(12), 3889– 3900. https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.-F., ... Niebel, A. (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *Journal of Experimental Botany*, *65*(2), 481–494. https://doi.org/10.1093/jxb/ert392
- Laskowski, M., Grieneisen, V. A., Hofhuis, H., Hove, C. A. ten, Hogeweg, P., Marée, A. F. M., & Scheres, B. (2008). Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. *PLOS Biology*, 6(12), e307. Retrieved from https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060307
- Lee, H. W., Cho, C., & Kim, J. (2015). Lateral Organ Boundaries Domain16 and 18 Act Downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 168(4), 1792–1806. https://doi.org/10.1104/pp.15.00578
- Lee, H. W., Kang, N. Y., Pandey, S. K., Cho, C., Lee, S. H., & Kim, J. (2017). Dimerization in LBD16 and LBD18 Transcription Factors Is Critical for Lateral Root Formation. *Plant Physiology*, 174(1), 301– 311. https://doi.org/10.1104/pp.17.00013
- Lee, H. W., & Kim, J. (2013). EXPANSINA17 Up-Regulated by LBD18/ASL20 Promotes Lateral Root Formation During the Auxin Response. *Plant and Cell Physiology*, 54(10), 1600–1611. https://doi.org/10.1093/pcp/pct105
- Lee, H. W., Kim, N. Y., Lee, D. J., & Kim, J. (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(3), 1377–1389.
- Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., & Zhang, J.-Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. Frontiers in Plant Science, 7, 47. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047
- Li, X., Lei, M., Yan, Z., Wang, Q., Chen, A., Sun, J., ... Wang, Y. (2014). The REL3-mediated TAS3 ta-siRNA pathway integrates auxin and ethylene signaling to regulate nodulation in Lotus japonicus. *The New Phytologist*, 201(2), 531–544. https://doi.org/10.1111/nph.12550
- Limpens, E., & Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 343–350.
- Lin, W., Shuai, B., & Springer, P. S. (2003). The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *The Plant Cell*, 15(10), 2241–2252. https://doi.org/10.1105/tpc.014969

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
- Lu, Y., Feng, Z., Liu, X., Bian, L., Xie, H., Zhang, C., ... Liang, J. (2018). MiR393 and miR390 synergistically regulate lateral root growth in rice under different conditions. *BMC Plant Biology*, 18(1), 261. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1488-x
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., ... Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958), 637–640. https://doi.org/10.1038/nature02045
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., ... Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume Lotus japonicus. *Nature Communications*, 1(1), 10. https://doi.org/10.1038/ncomms1009
- Majer, C., & Hochholdinger, F. (2011). Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science*, *16*(1), 47–52. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.009
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)*, 124(1), 33–44. https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, *17*(5), 1360–1375. https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *The Plant Cell*, *14*(3), 589–597. https://doi.org/10.1105/tpc.010354
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., ... Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell*, *22*(4), 1104–1117. https://doi.org/10.1105/tpc.109.072553
- Mathesius, U. (2008). Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development. *Functional Plant Biology FPB*. Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing.
- Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y., & Machida, C. (2009). Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) family in Arabidopsis thaliana, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *58*(3), 525–537. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03797.x
- Meade, H. M., & Signer, E. R. (1977). Genetic mapping of Rhizobium meliloti. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(5), 2076–2078. https://doi.org/10.1073/pnas.74.5.2076
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L. H., Jayaraman, D., Rouge, P., Barre, A., ... Ane, J.-M. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 20(8), 912–921. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0912
- Middleton, P. H., Jakab, J., Penmetsa, R. V., Starker, C. G., Doll, J., Kalo, P., ... Oldroyd, G. E. D. (2007). An ERF transcription factor in Medicago truncatula that is essential for Nod factor signal transduction. *The Plant Cell*, *19*(4), 1221–1234. https://doi.org/10.1105/tpc.106.048264
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., ... Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, *133*(1), 128–141. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.033

- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), 1306–1311. https://doi.org/10.1126/science.1191937
- Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrásek, J., Skůpa, P., ... Friml, J. (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development (Cambridge, England)*, 135(20), 3345–3354. https://doi.org/10.1242/dev.021071
- Murray, J. D. (2011). Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. *Molecular Plant-Microbe* Interactions®, 24(6), 631–639. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0181
- Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., & Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5808), 101–104. https://doi.org/10.1126/science.1132514
- Nadzieja, M., Kelly, S., Stougaard, J., & Reid, D. (2018). Epidermal auxin biosynthesis facilitates rhizobial infection in Lotus japonicus. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *95*(1), 101–111. https://doi.org/10.1111/tpj.13934
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., & Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *55*(2), 175–187. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x
- Nizampatnam, N. R., Schreier, S. J., Damodaran, S., Adhikari, S., & Subramanian, S. (2015). microRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 84(1), 140–153. https://doi.org/10.1111/tpj.12965
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(1), 118–130. https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761
- Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H. L., & Theologis, A. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *43*(1), 29–46. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02426.x
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., ... Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, *17*(2), 444–463. https://doi.org/10.1105/tpc.104.028316
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(4), 252–263. https://doi.org/10.1038/nrmicro2990
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 519–546. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, *45*, 119–144. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Omary, M., Gil-Yarom, N., Yahav, C., Steiner, E., Hendelman, A., & Efroni, I. (2022). A conserved superlocus regulates above- and belowground root initiation. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6584), eabf4368. https://doi.org/10.1126/science.abf4368
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a001537. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537
- Pandey, S. K., Lee, H. W., Kim, M.-J., Cho, C., Oh, E., & Kim, J. (2018). LBD18 uses a dual mode of a positive feedback loop to regulate ARF expression and transcriptional activity in Arabidopsis. *The*

Plant Journal, 95(2), 233-251. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13945

- Pecrix, Y., Staton, S. E., Sallet, E., Lelandais-Brière, C., Moreau, S., Carrère, S., ... Gamas, P. (2018). Wholegenome landscape of Medicago truncatula symbiotic genes. *Nature Plants*, 4(12), 1017–1025. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0286-7
- Peng, J., Berbel, A., Madueño, F., & Chen, R. (2017). AUXIN RESPONSE FACTOR3 Regulates Compound Leaf Patterning by Directly Repressing PALMATE-LIKE PENTAFOLIATA1 Expression in Medicago truncatula. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1630. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01630
- Penmetsa, & Cook. (1997). A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science (New York, N.Y.), 275*(5299), 527–530.
- Péret, B., Larrieu, A., & Bennett, M. J. (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. Journal of Experimental Botany, 60(13), 3637–3643. https://doi.org/10.1093/jxb/erp232
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(1), 180–201.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295. https://doi.org/10.1038/nbt.3122
- Pislariu, C. I., Murray, J. D., Wen, J., Cosson, V., Muni, R. R. D., Wang, M., ... Udvardi, M. K. (2012). A Medicago truncatula tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiology*, 159(4), 1686–1699. https://doi.org/10.1104/pp.112.197061
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., ... Frugier, F. (2011). MtCRE1dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in Medicago truncatula. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 65(4), 622–633. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x
- Prayitno, J., Rolfe, B. G., & Mathesius, U. (2006). The Ethylene-insensitive sickle mutant of Medicago truncatula shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiology*, 142(1), 168–180. https://doi.org/10.1104/pp.106.080093
- QUANDT, H. J., Pühler, A., & 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. https://doi.org/https://doi.org/10.1094/MPMI-6-699
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E. B., & Baskin, T. I. (2007). Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 50(3), 514–528. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03068.x
- Reynoso, Mauricio A, Kajala, K., Bajic, M., West, D. A., Pauluzzi, G., Yao, A. I., ... Bailey-Serres, J. (2019). Evolutionary flexibility in flooding response circuitry in angiosperms. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6459), 1291–1295. https://doi.org/10.1126/science.aax8862
- Reynoso, Mauricio Alberto, Blanco, F. A., Bailey-Serres, J., Crespi, M., & Zanetti, M. E. (2013). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in Medicago truncatula. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *73*(2), 289–301. https://doi.org/10.1111/tpj.12033
- Rightmyer, A. P., & Long, S. R. (2011). Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant Medicago truncatula in response to auxin transport inhibitors. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 24*(11), 1372–1384. https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0103
- Roth, L. E., & Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology*, 49(1), 13–23.

- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., ... Gamas, P. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using lasercapture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 77(6), 817–837. https://doi.org/10.1111/tpj.12442
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., ... Udvardi, M. K. (2020).
  Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279
- Satgé, C., Moreau, S., Sallet, E., Lefort, G., Auriac, M.-C., Remblière, C., ... Gamas, P. (2016). Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in Medicago truncatula. *Nature Plants*, 2(11), 16166. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.166
- Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., ... Oldroyd, G. E. D. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in Medicago truncatula. *Current Biology*, 29(21), 3657-3668.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.005
- Scofield, S., & Murray, J. A. H. (2006). The evolving concept of the meristem. *Plant Molecular Biology*, 60(6), V–VII. https://doi.org/10.1007/s11103-006-0061-4
- Shen, C., Yue, R., Sun, T., Zhang, L., Xu, L., Tie, S., ... Yang, Y. (2015). Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in Medicago truncatula. *Frontiers in Plant Science*, 6, 73. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00073
- Shrestha, A., Zhong, S., Therrien, J., Huebert, T., Sato, S., Mun, T., ... Szczyglowski, K. (2021). Lotus japonicus Nuclear Factor YA1, a nodule emergence stage-specific regulator of auxin signalling. *New Phytologist*, 229(3), 1535–1552. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.16950
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G., & Springer, P. S. (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology*, 129(2), 747–761. https://doi.org/10.1104/pp.010926
- Sieberer, B. J., Chabaud, M., Timmers, A. C., Monin, A., Fournier, J., & Barker, D. G. (2009). A nucleartargeted cameleon demonstrates intranuclear Ca2+ spiking in Medicago truncatula root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiology*, 151(3), 1197–1206. https://doi.org/10.1104/pp.109.142851
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., & Parniske, M. (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 139–152. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.011
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & 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*(3), e1003352. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003352
- Soyano, T., Shimoda, Y., Kawaguchi, M., & Hayashi, M. (2019). A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus. *Science (New York, N.Y.), 366*(6468), 1021–1023. https://doi.org/10.1126/science.aax2153
- Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y., & Chua, N.-H. (2008). ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 Regulate Tracheary Element Differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(12), 3359–3373. https://doi.org/10.1105/tpc.108.061796
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., ... Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417(6892), 959–962. https://doi.org/10.1038/nature00841
- Su, C., Zhang, G., Rodriguez-Franco, M., Hinnenberg, R., Wietschorke, J., Liang, P., ... Ott, T. (2023). Transcellular progression of infection threads in Medicago truncatula roots is associated with locally confined cell wall modifications. *Current Biology : CB*, 33(3), 533-542.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.051

- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10(8), 946–954. https://doi.org/10.1038/ncb1754
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., ... Mysore, K. S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 54(2), 335–347. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03418.x
- Taiz L and Zeiger E. (2006). Fisiologia vegetal (3ta.Ed. Un).
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., ... Town, C. D. (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume Medicago truncatula. *BMC Genomics*, 15(1), 312. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-312
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(11), 847–859. https://doi.org/10.1038/nrm2020
- Tian, C. F., Garnerone, A.-M., Mathieu-Demaziere, C., Masson-Boivin, C., & Batut, J. (2012). Plantactivated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the Sinorhizobium meliloti-Medicago symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6751–6756. https://doi.org/10.1073/pnas.1120260109
- Timmers, A. C., Auriac, M. C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126(16), 3617–3628. https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3617
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L. H., Miwa, H., ... Stougaard, J. (2006). Deregulation of a Ca2+/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, 441(7097), 1153–1156. https://doi.org/10.1038/nature04862
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., ... Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science (New York, N.Y.), 315*(5808), 104–107. https://doi.org/10.1126/science.1132397
- Tiwari, S B, Wang, X. J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *The Plant Cell*, *13*(12), 2809–2822. https://doi.org/10.1105/tpc.010289
- Tiwari, Shiv B, Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxinresponsive transcription. *The Plant Cell*, *15*(2), 533–543. https://doi.org/10.1105/tpc.008417
- Tominaga-Wada, R., Ishida, T., & Wada, T. (2011). New insights into the mechanism of development of Arabidopsis root hairs and trichomes. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *286*, 67–106. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385859-7.00002-1
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., ... Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016
- Traubenik, S., Reynoso, M. A., Hobecker, K., Lancia, M., Hummel, M., Rosen, B., ... 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(2), 352–373. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00647
- Turner, M., Nizampatnam, N. R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., ... Subramanian, S. (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiology*, 162(4), 2042–2055. https://doi.org/10.1104/pp.113.220699

Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., ... Beeckman, T.

(2005). Cell Cycle Progression in the Pericycle Is Not Sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-Mediated Lateral Root Initiation in Arabidopsis thaliana . *The Plant Cell*, *17*(11), 3035–3050. https://doi.org/10.1105/tpc.105.035493

- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., & Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, *172*(8), 4295–4306.
- Vernie, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., ... Oldroyd, G. E. D. (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the Medicago truncatula Root. *The Plant Cell*, *27*(12), 3410–3424. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00461
- Vernié, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.-P., Rogers, C., ... 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(10), 2696–2713. https://doi.org/10.1105/tpc.108.059857
- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., ... Traas, J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular Systems Biology*, 7, 508. https://doi.org/10.1038/msb.2011.39
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046
- Waidmann, S., Sarkel, E., & Kleine-Vehn, J. (2020). Same same, but different: growth responses of primary and lateral roots. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2397–2411. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa027
- Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W., & Chen, X.-Y. (2005). Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(8), 2204–2216. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033076
- Wang, Y., Li, K., Chen, L., Zou, Y., Liu, H., Tian, Y., ... Li, X. (2015). MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors GmARF8a and GmARF8b Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Physiology*, *168*(3), 984–999. https://doi.org/10.1104/pp.15.00265
- Weijers, D., & Wagner, D. (2016). Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annual Review of Plant Biology*, *67*, 539–574. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112122
- Wilmoth, J. C., Wang, S., Tiwari, S. B., Joshi, A. D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., ... Reed, J. W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 43(1), 118–130. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02432.x
- Wu, M.-F., Yamaguchi, N., Xiao, J., Bargmann, B., Estelle, M., Sang, Y., & Wagner, D. (2015). Auxinregulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *ELife*, 4, e09269. https://doi.org/10.7554/eLife.09269
- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., ... Bisseling, T. (2014). Fate map of Medicago truncatula root nodules. *Development (Cambridge, England)*, 141(18), 3517–3528. https://doi.org/10.1242/dev.110775
- Xu, C., Luo, F., & Hochholdinger, F. (2016). LOB Domain Proteins: Beyond Lateral Organ Boundaries. *Trends in Plant Science*, 21(2), 159–167. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.010
- Yan, J., Cai, X., Luo, J., Sato, S., Jiang, Q., Yang, J., ... Luo, D. (2010). The REDUCED LEAFLET genes encode key components of the trans-acting small interfering RNA pathway and regulate compound leaf and flower development in Lotus japonicus. *Plant Physiology*, 152(2), 797–807. https://doi.org/10.1104/pp.109.140947

Yifhar, T., Pekker, I., Peled, D., Friedlander, G., Pistunov, A., Sabban, M., ... Eshed, Y. (2012). Failure of

the tomato trans-acting short interfering RNA program to regulate AUXIN RESPONSE FACTOR3 and ARF4 underlies the wiry leaf syndrome. *The Plant Cell*, *24*(9), 3575–3589. https://doi.org/10.1105/tpc.112.100222

- Young, N. D., Debelle, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., ... Roe, B. A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480(7378), 520–524. https://doi.org/10.1038/nature10625
- Zanetti, M. E., Blanco, F. A., Beker, M. P., Battaglia, M., & 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(12), 4142–4157. https://doi.org/10.1105/tpc.110.079137
- Zhang, Y., Ii, Z., Ma, B., Hou, Q., & Wan, X. (2020). Phylogeny and Functions of LOB Domain Proteins in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 2278. https://doi.org/10.3390/ijms21072278
- Zhou, C., Han, L., Fu, C., Wen, J., Cheng, X., Nakashima, J., ... Wang, Z.-Y. (2013). The trans-acting short interfering RNA3 pathway and no apical meristem antagonistically regulate leaf margin development and lateral organ separation, as revealed by analysis of an argonaute7/lobed leaflet1 mutant in Medicago truncatula. *The Plant Cell*, 25(12), 4845–4862. https://doi.org/10.1105/tpc.113.117788
- Zumft, W. G., & Mortenson, L. E. (1975). The nitrogen-fixing complex of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, *416*(1), 1–52.