



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Tesis doctoral

Caracterización molecular de nódulos eficientes e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno durante la simbiosis entre rizobios y *Medicago* spp.

Lic. Abril Luchetti

Director: Prof. Dr. Gonzalo Torres Tejerizo

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

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Caracterización molecular de nódulos eficientes e
ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno durante la
simbiosis entre rizobios y *Medicago* spp.**

Tesista: Lic. Abril Luchetti

Director: Dr. Gonzalo Torres Tejerizo

Año: 2024

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Gonzalo Torres Tejerizo.

A mis padres

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por formarme y darme las herramientas necesarias para mi carrera. Por una universidad pública, gratuita y de calidad siempre.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular por brindarme el lugar y equipamiento necesario para desarrollar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca que me permitió dedicarme a la investigación científica.

Al programa de cooperación entre Argentina y Alemania (ALE-ARG DAAD) por haberme otorgado una beca para desarrollar parte de este trabajo en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

Mi más profundo agradecimiento,

A Gonzalo, por dirigir esta tesis y brindarme su apoyo durante todos estos años. Gracias por tu compromiso con este trabajo y mi formación científica. Gracias por estar y responder mis interminables dudas. Gracias por enseñarme tanto y por tu confianza en mí.

Al Dr. Karsten Niehaus, por su amabilidad y recibimiento en Alemania. Gracias por el entusiasmo al discutir mis experimentos y por haberme brindado todos los recursos para poder llevarlos a cabo.

A Sofi, por tu enorme amistad. Gracias por tu cariño incondicional. Gracias por hacerme mejor persona y enseñarme tanto. Gracias por tus abrazos fuertes y por compartir este camino conmigo.

A Carito, por tu amistad y apoyo incondicional. Gracias por hacerme ver las cosas de otra manera, por ver siempre el vaso medio lleno. Gracias por todos los momentos que compartimos en Alemania y por ser mi familia donde sea que estemos.

A Carito y Sofi en conjunto, por ser el mejor dúo de amigas y compañeras de trabajo que se puede tener. Gracias por todas las charlas, viajes, bebidas variadas y discusiones científicas. Realmente no me alcanzan las palabras para agradecerles su amistad.

A Cata y Delfi, por su ayuda y apoyo durante este último tramo del doctorado. Gracias por ser un gran equipo de trabajo, tanto en lo humano como en lo profesional. Gracias por leer con tanta dedicación esta tesis.

A Lucas, por enseñarme tanto desde la tesina y acompañarme durante toda la tesis. Gracias por todos los mates y charlas en la oficina. Gracias por leer esta tesis y discutir los resultados con tantas ganas.

A todos los becarios RPS, por el compañerismo, las charlas, risas y los almuerzos de mesas largas. Gracias por compartir el día a día de trabajo y hacerlo mucho más divertido. Gracias a todos los que están y estuvieron: Coty, Agus, Caro, Sofi, Delfi, Cata, Abru, Deni, Pili, Kei, Rama, Nico, Martin, Eze, Gonza, Hila, Lucas, Yuli y Jose.

A Mariano, Tony, Flor, Walter, Charly y Mauri, por armar este gran grupo de trabajo que tenemos. Gracias por su ayuda y apoyo durante estos años.

A JPG, por los consejos y discusiones científicas. Gracias por todas tus anécdotas, nunca te quedes sin alguna para contar.

A Yuli, por su acompañamiento constante aún en la distancia. Gracias por escucharme y entenderme siempre.

A Florcita, por estar conmigo desde el armado de la carpeta de CONICET. Gracias por las charlas y cafecitos, por tener siempre un consejo y palabra de aliento listo para dar.

A Delfi, por hacerme reír tanto y acompañarme desde la facultad. Gracias por todas las quejas compartidas.

A mis compañeros de W7, Jens, Mohannad, Michael, Anna, Judith y Annca. Por su amabilidad y recibimiento durante mi estadía en Bielefeld. A Judith, por toda su ayuda con mis experimentos.

A Eva, por su cariño y ayuda en el laboratorio.

A Hanna, por su amabilidad y ayuda con el microscopio confocal.

A todos los integrantes del IBBM, becarios, investigadores, profesionales y administrativos, por su calidad humana y científica. Gracias a todos los que me ayudaron durante estos años de trabajo.

Finalmente,

A mis padres, por su apoyo y cariño constante e incondicional. Gracias por los abrazos y palabras de aliento. Gracias por acompañarme incluso a la distancia. Gracias por brindarme todas las oportunidades y a alentarme a hacer lo que quiero.

A mis hermanos, por el cariño, acompañamiento y aliento. Gracias por ser incondicionales. Gracias por llevarme a todos lados.

A mis amigos de toda la vida, Meli, Juli, Anyu, Leo, Juli M. y Pedro. Gracias por bancarme y siempre estar ahí. Gracias por todas las charlas y risas. Gracias por su amistad. Gracias Pe, porque, aunque estemos en distintos husos horarios sabemos encontrarnos. Gracias Cami y Juli, por las comidas improvisadas y las catarsis compartidas.

A Juli y Aru, por todo lo compartido en Alemania. Gracias por los almuerzos y sobremesas eternos en el mensa.

A los amigos que me dio la facultad, por su amistad, apoyo y contención. Gracias por todos los momentos compartidos. A Manu y Lucas, por los viajes, risas y cervezas en Alemania.

A mis tíos y primos, por el cariño y acompañarme siempre.

A mi abuela Elsa, a quien sé que le hubiera encantado leer esta tesis y estar presente en la defensa. Gracias porque desde donde estés estoy segura de que me estas acompañando.

A todas las personas que me apoyaron y acompañaron en este camino.

Índice general

Capítulo I: Introducción	1
I.1. Microorganismos y su asociación con plantas	3
I.1.1. Los microbiomas de plantas	3
I.1.2. Aplicaciones microbianas en los cultivos agrícolas	5
I.2. Biodisponibilidad de nitrógeno en los suelos: la simbiosis rizobio-leguminosa	5
I.2.1. Las leguminosas	6
I.2.2. Los rizobios	7
I.3. Establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno	8
I.3.1. Interacción temprana: flavonoides y factores de nodulación	9
I.3.2. Colonización de las raíces y formación de hilos de infección	12
I.3.3. Organogénesis del nódulo	14
I.3.4.A. Nódulos determinados e indeterminados	15
I.3.4. Formación de simbiosomas	16
I.3.5. Diferenciación bacteriana: determinantes bacterianos y de la planta ..	17
I.3.6. Fijación biológica de nitrógeno.....	19
I.3.8. Senescencia y respuesta de defensa	22
I.4. Estudio de la simbiosis <i>Rhizobium</i> – <i>Medicago</i>	24
I.4.1. Estudio de la expresión genética durante la simbiosis	24
I.4.2. <i>Rhizobium favelukesii</i> LPU83	27
I.5. Modelo de estudio y consideraciones generales	29
Hipótesis de trabajo	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Capítulo II: Materiales y métodos	33
II.1. Procedimientos microbiológicos.....	35
II.1.1. Cepas bacterianas utilizadas	35
II.1.2. Medios de cultivo y crecimiento de microorganismos.....	36
II.1.2.A. Medios y condiciones de cultivo	36
II.1.2.B. Medios de conservación	36
II.1.2.C. Antibióticos utilizados.....	37
II.1.3. Recuento de bacterias viables	37
II.1.4. Transformación de células electrocompetentes	37
II.1.5. Conjugaciones triparentales.....	38
II.1.6. Mutantes por doble recombinación homóloga.....	38
II.2. Técnicas de biología molecular.....	39
II.2.1. Plásmidos utilizados	39
II.2.2. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala (“miniprep”)	40

II.2.3. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	40
II.2.4. Electroforesis en geles de agarosa	41
II.2.5. Geles de lisis <i>in situ</i>	42
II.2.6. Purificación de fragmentos de gel de agarosa	42
II.2.7. Tratamientos enzimáticos del ADN	43
II.2.8. Construcción de cepas complementadas en genes simbióticos.....	43
II.2.9. Construcción de cepas mutantes de LPU83	43
II.2.9.A. Mutante en LPU83_pLPU83b_0539 (Δ 0539:: Ω Gm).....	43
II.2.9.B. Mutante en LPU83_1075 (Δ 1075).....	44
II.2.9.C. Mutante LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_1075 (Δ 0539-1075)	44
II.2.10. Construcción de plásmidos para expresar las peptidasas dentro del nódulo.....	44
II.2.10.A. Construcción del plásmido pPG013::0539-40	44
II.2.10.B. Construcción del plásmido pPG013::0539	45
II.2.10.C. Construcción del plásmido pPG013::1075	45
II.3. Ensayos en planta	46
II.3.1. Esterilización y germinación de semillas	46
II.3.2. Condiciones de crecimiento	46
II.3.3. Inoculación de las raíces	47
II.3.4. Procesamiento de las plantas	47
II.3.4.A. Recuento de viables bacterias viables de nódulo.....	48
II.3.4.B. Procesamiento general de las plantas	48
II.4. Microscopía de nódulos	48
II.4.1. Microscopio óptico	48
II.4.2. Microscopía confocal	49
II.4.3. Microscopía electrónica	50
II.5. Transcriptómica dual.....	50
II.5.1. Condiciones y obtención de las muestras	50
II.5.2. Construcción de bibliotecas y secuenciación	51
II.5.3. Procesamiento de los datos de RNA-seq.....	52
II.5.3.A. Calidad y mapeos de las muestras	52
II.5.3.B. Análisis de expresión diferencial	52
II.5.3.C. Análisis de enriquecimiento de genes	52
II.6. Proteómica de bacterias en vida libre	52
II.6.1. Extracción de proteínas totales para ensayo proteómico	52
II.6.2. Purificación de muestras e identificación de péptidos por LC/MS-MS53	
II.6.3. Análisis de los datos proteómicos	54
II.7. Determinación de nivel de endorreduplicación de los bacteroides	54
II.8. Herramientas bioinformáticas utilizadas	54

Capítulo III: Caracterización de nódulos eficientes e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno	57
III.1. Introducción	59
III.2. Caracterización histológica de nódulos de <i>R. favelukesii</i> LPU83 mediante microscopía óptica	59
III.3. Caracterización de la estructura de nódulos y el estado fisiológico de las bacterias mediante microscopía confocal.....	63
III.4. Conclusiones parciales	67
Capítulo IV: Estudio de nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno mediante transcriptómica dual	69
IV.1. Introducción	71
IV.2. Esquema experimental y secuenciación masiva	71
IV.3. Estudio del transcriptoma de <i>M. truncatula</i> en nódulos eficientes e ineficientes..	73
IV.3.1. Análisis general del transcriptoma de <i>M. truncatula</i>	73
IV.3.1.A. Respuesta general al desarrollo del nódulo	78
IV.3.1.B. Respuesta en nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno	79
IV.3.1.C. Respuesta frente a nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno	81
IV.3.2. Diferencias entre nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de N	82
IV.3.2.A. Análisis de enriquecimiento de genes en la comparación entre nódulos eficientes e ineficientes.....	82
IV.3.2.B. Genes simbióticos necesarios en <i>M. truncatula</i>	86
IV.3.2.C. Genes asociados a senescencia	89
IV.4. Estudio de los transcriptomas bacterianos en vida libre y dentro de nódulos de <i>M. truncatula</i>	90
IV.4.1. Transcriptoma de <i>R. favelukesii</i> LPU83	90
IV.4.2. Transcriptoma de <i>S. meliloti</i> 2011	95
IV.4.3. Bacteroides eficientes e ineficientes: genes ortólogos y su comportamiento	100
IV.4.3.A. Genes ortólogos con igual tendencia de expresión	100
IV.4.3.B. Genes ortólogos con expresión inversa	101
IV.5. Conclusiones parciales	102
Capítulo V: Alteraciones transcripcionales, morfológicas y fisiológicas de los bacteroides en nódulos ineficientes	105
V.1. Introducción	107
V.2. Expresión de genes involucrados en la división celular.....	108
V.3. Caracterización morfológica de nódulos mediante microscopía electrónica de barrido	109
V.4. Viabilidad y endopoliploidía de los bacteroides	113

V. 5. Conclusiones parciales	116
Capítulo VI: Evaluación y expresión heteróloga de genes simbióticos durante el desarrollo de nódulos de <i>R. favelukesii</i>	119
VI.1. Introducción.....	121
VI.2. Expresión de genes simbióticos en nódulos eficientes e ineficientes en la FBN122	
VI.3. Complementación de LPU83 con genes simbióticos de <i>S. meliloti</i>	125
VI.4. Estudio de la morfología de los nódulos infectados por cepas portadoras de los plásmidos pNod y pNif.....	128
VI.5. Complementación con plásmidos pNod y pNif en el entorno de <i>S. meliloti</i>	132
VI.6. Conclusiones parciales.....	135
Capítulo VII: Expresión de NCRs en nódulos eficientes e ineficientes y rol de peptidasas bacterianas que los degradan	137
VII.1. Introducción.....	139
VII.2. Expresión de NCRs en nódulos eficientes e ineficientes	140
VII.3. Búsqueda de proteínas homólogas a Hrrp y SapA en LPU83.....	145
VII.4. Análisis de la expresión transcripcional de los genes que codifican para las posibles peptidasas	147
VII.5. Caracterización de los mutantes en las peptidasas en <i>R. favelukesii</i> LPU83... ..	148
VII.6. Efecto de la sobreexpresión de las peptidasas en el fenotipo simbiótico	150
VII.7. Conclusiones parciales.....	153
Capítulo VIII. Discusión general y conclusiones	155
VIII.1. Discusión general y conclusiones.....	157
VIII.2. Perspectivas.....	170
Anexo	173
Bibliografía	179

Índice de Figuras

Figura I.1	Microbiomas de plantas.	4
Figura I.2	Señalización entre planta y rizobio durante la simbiosis.	11
Figura I.3	Estructura de nódulos determinados e indeterminados.	16
Figura I.4	Formación del simbiosoma.	17
Figura I.5	Intercambio de nutrientes y regulación del desarrollo del bacteroide.	21
Figura I.6	Análisis de nódulos senescentes en <i>M. truncatula</i> .	24
Figura I.7	Comparación de genes de la simbiosis fijadora de nitrógeno en diferentes especies.	26
Figura I.8	Análisis filogenético del <i>R. favelukesii</i> LPU83.	28
Figura III.1	Microscopía óptica de los nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno.	62
Figura III.2	Células simbióticas de la zona III de nódulos de <i>M. truncatula</i> observados al microscopio óptico. A	63
Figura III.3	Secciones de nódulos eficientes e ineficientes de <i>M. sativa</i> a distintos tiempos post inoculación.	65
Figura III.4	Secciones de nódulos eficientes e ineficientes de <i>M. truncatula</i> a distintos tiempos post inoculación.	66
Figura IV.1	Esquema de trabajo para el ensayo de transcriptómica dual	72
Figura IV.2	Análisis general del transcriptoma de <i>M. truncatula</i> .	74
Figura IV.3	<i>UpSet plot</i> de los genes expresados diferencialmente en las distintas comparaciones realizadas.	77
Figura IV.4	Distribución de GEDs en los replicones de LPU83.	91
Figura IV.5	Distribución de GEDs de LPU83 en las cuatro categorías generales de COGs.	92
Figura IV.6	Representación de COGs entre los genes diferencialmente expresados de LPU83.	93
Figura IV.7	Comparación entre transcriptomas de bacteroides de LPU83 a 31 dpi contra bacteroides a 10 dpi.	94
Figura IV.8	Distribución de GEDs en los replicones de Sm2011.	96
Figura IV.9	Distribución de GEDs de Sm2011 en las cuatro categorías generales de COGs	97
Figura IV.10	Representación de COGs entre los genes diferencialmente expresados de Sm2011	98
Figura IV.11	Comparación entre transcriptomas de bacteroides de Sm2011 a 31 dpi contra bacteroides a 10 dpi.	99

Figura V.1	Microscopía electrónica de barrido de nódulos eficientes e ineficientes en la FBN.	111
Figura V.2	Observaciones al microscopio electrónico de barrido de bacterias en vida libre y bacterias aisladas de nódulos.	112
Figura V.3	Largo de las bacterias y bacteroides aisladas de nódulos.	113
Figura V.4	Recuento de bacterias viables de nódulos.	114
Figura V.5	Endorreduplicación de los genomas bacterianos.	116
Figura VI.1	Esquema de los plásmidos pNod y pNif utilizados en este trabajo.	126
Figura VI.2	Efecto de la presencia de los plásmidos pNod y pNif en el fenotipo simbiótico de LPU83	127
Figura VI.3	Estudio de la morfología de los nódulos de <i>M. truncatula</i> a los 14 dpi.	129
Figura VI.4	Estudio de la morfología de los nódulos de <i>M. truncatula</i> a los 31 dpi.	131
Figura VI.5	Recuento de bacterias viables de nódulos infectados por cepas complementadas.	132
Figura VI.6	<i>S. meliloti</i> Sma818R complementada con pNod y/o pNif.	134
Figura VII.1	Expresión de NCRs en nódulos eficientes e ineficientes.	141
Figura VII.2	Estructura génica y dominios de las peptidasas presentes en <i>S. meliloti</i> y en LPU83.	146
Figura VII.3	Efecto de la mutación de las peptidasas presentes en LPU83 en <i>M. truncatula</i> A20.	149
Figura VII.4	Resultados de la sobreexpresión de las peptidasas de LPU83 en <i>M. truncatula</i> A20.	151
Figura VII.5	Recuento de bacterias viables de los nódulos de <i>M. truncatula</i> A20.	152
Figura VII.6	Microscopía confocal de nódulos de <i>M. truncatula</i> A20.	153

Índice de Tablas

Tabla II.1	Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo	35
Tabla II.2	Medios de cultivo utilizados	36
Tabla II.3	Plásmidos utilizados en este trabajo	39
Tabla II.4	Cebadores utilizados en este trabajo	41
Tabla II.5	Composición del medio Rolfe.	47
Tabla IV.1	Comparación de la secuenciación de cada una de las muestras realizadas	73
Tabla IV.2	Comparaciones entre los nódulos infectados por las distintas cepas a 10 y 31 dpi.	75
Tabla IV.3	Diferencias en la expresión genética al comparar nódulos de 31 dpi contra 10 dpi.	76
Tabla IV.4	Análisis de enriquecimiento de genes involucrados en la respuesta general al desarrollo del nódulo en <i>M. truncatula</i> .	78
Tabla IV.5	Análisis de enriquecimiento de la respuesta de <i>M. truncatula</i> frente a nódulos eficientes en la FBN.	80
Tabla IV.6	Vías enriquecidas en la respuesta de <i>M. truncatula</i> a nódulos ineficientes en la FBN a 31 dpi.	81
Tabla IV.7	Vías enriquecidas en la comparación de nódulos de <i>M. truncatula</i> eficientes contra ineficientes a 10 dpi.	83
Tabla IV.8	Vías enriquecidas en la comparación de nódulos de <i>M. truncatula</i> eficientes contra ineficientes a 31 dpi.	85
Tabla IV.9	Genes simbióticos con expresión diferencial entre nódulos eficientes e ineficientes a 10 dpi.	87
Tabla IV.10	Genes simbióticos con expresión diferencial entre nódulos eficientes e ineficientes a 31 dpi.	88
Tabla IV.11	Genes expresados diferencialmente presentes en el grupo de genes centrales asociados a senescencia.	89
Tabla IV.12	Genes expresados diferencialmente en las muestras correspondientes a LPU83.	90
Tabla IV.13	Genes diferencialmente expresados en las muestras correspondientes a Sm2011.	95
Tabla IV.14	GEDs ortólogos con igual tendencia dentro de los bacteroides de LPU83 y Sm2011.	101
Tabla IV.15	Genes ortólogos con expresión inversa entre bacteroides eficientes e ineficientes en la fijación de N.	102
Tabla V.1	Expresión de genes relacionados a la división celular y replicación del ADN.	109
Tabla V.2	Porcentaje de endopoliploidía de las cepas utilizadas en este trabajo en vida libre y en nódulos de <i>Medicago</i> spp.	115
Tabla VI.1	Expresión de genes simbióticos en LPU83 y Sm2011.	124

Tabla VII.1	NCRs expresados diferencialmente en cada <i>cluster</i> .	143
Tabla VII.2	Lecturas normalizadas de NCRs en nódulos de Sm2011 y LPU83.	145
Tabla VII.3	Expresión de peptidasas en LPU83.	147
Tabla VII.4	Valor de las lecturas normalizadas para las peptidasas presentes en LPU83.	148

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
COG	<i>Cluster of orthologs groups</i>
DO600	Densidad Optica a 600 nm
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
dpi	Días post inoculación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
spp	Especies
ROS	Especies reactivas del oxígeno, " <i>Reactive Oxygen Species</i> "
Sp	Espectinomicina
Sm	Estreptomycin
EPS	Exopolisacarido
FN	Factores Nod
FBN	Fijacion Biologica de Nitrogeno
GED	Genes expresados diferencialmente
Gm	Gentamicina
°C	Grado Celsius
g	Gramo
hs	Horas
Km	Kanamycin
Kb	Kilobase
LPS	Lipopolisacárido
LCO	Lipoquitooligosacaridos
l	Litro
TY	Medio de cultivo triptona extracto de levadura
VMM	Medio mínimo de crecimiento bacteriano
Mpb	Megabase= 1x10 ⁶ pb
µm	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
nM	Nanomolar
Nm	Neomicina
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, " <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
rpm	Revoluciones por minuto
Tc	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colonias

Capítulo I: Introducción



I.1. Microorganismos y su asociación con plantas

El estudio de la interacción entre las plantas y los microorganismos tiene más de 200 años de antigüedad. A lo largo de este tiempo, más precisamente en el siglo XIX, se introdujo el concepto de simbiosis. Esto es, la interacción entre organismos que pueden ayudarse, o no, a sobrevivir. Las bacterias son capaces de interactuar con organismos de mayor complejidad de manera simbiótica o parasítica. Para que la relación simbiótica sea benéfica para ambos organismos, estos deben expresar una serie de determinantes regulados que les permitan coexistir. Considerando la interacción entre las plantas y los microorganismos, durante años el principal foco de estudio fue la simbiosis entre leguminosas con micorrizas y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos presentes en las raíces de dichas plantas. Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que las plantas poseen una microbiota extremadamente variada, no sólo en la rizosfera, región próxima a las raíces de las plantas, sino también en las raíces, tallo, hojas, flores y semillas, revelando que esencialmente toda la planta se encuentra colonizada por microorganismos que interactúan con ella (Compant *et al.*, 2024).

Las plantas proporcionan múltiples nichos para la proliferación de diversos microorganismos incluyendo en mayor medida bacterias, pero también pueden encontrarse arqueas, hongos, protistas y virus (Compant *et al.*, 2024). Estos microorganismos interactúan de manera compleja con las plantas y son muy influyentes, determinando la productividad y la sanidad de la planta en su ambiente natural (Trivedi *et al.*, 2020). Estudios recientes permitieron identificar y caracterizar genes necesarios para la interacción entre la planta y sus microbiomas asociados, de manera de entender en mayor medida como los microorganismos se adaptan al ambiente de la planta (Delmotte *et al.*, 2009, Cole *et al.*, 2017, Levy *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2018, Trivedi *et al.*, 2020).

I.1.1. Los microbiomas de plantas

Tanto el suelo como la rizosfera son considerados los mayores reservorios de microbiota asociada a plantas. El microbioma asociado a la rizosfera se encuentra determinado en gran medida por los exudados de las plantas y la preferencia por sustratos de las bacterias presentes. Otros factores como las hormonas y compuestos liberados por las plantas alteran los microbiomas (Compant *et al.*, 2024). Los microorganismos pueden colonizar el rizoplaneo, superficie de la raíz, y subsecuentemente colonizar las raíces (Figura I.1). La filosfera comprende la parte aérea de la planta, incluyendo hojas y flores, y representa un hábitat colonizado por

microorganismos transportados desde las raíces por el xilema o a través de agua, polen y suelo (Figura I.1). Sin embargo, también pueden ingresar a la planta a través de heridas del tejido vegetal o por el estigma de las flores (Compant *et al.*, 2011, Compant *et al.*, 2024). Las diferencias en los microbiomas que se observan entre los distintos compartimentos de la planta indican que los mismos compartimentos son los principales encargados de alterar la composición de la microbiota (Trivedi *et al.*, 2020). La planta presenta una microbiota central (“core”) que consiste en un conjunto de microorganismos que persisten y son ubicuos en la mayoría de las comunidades asociadas con un huésped en particular (Astudillo-García *et al.*, 2017, Trivedi *et al.*, 2020). La microbiota central comprende taxones microbianos que portan genes esenciales para el crecimiento de la planta. En distintas especies de plantas, la microbiota central está formada por géneros de microorganismos como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Methylobacterium*, entre otros. Esto sugiere que los microorganismos

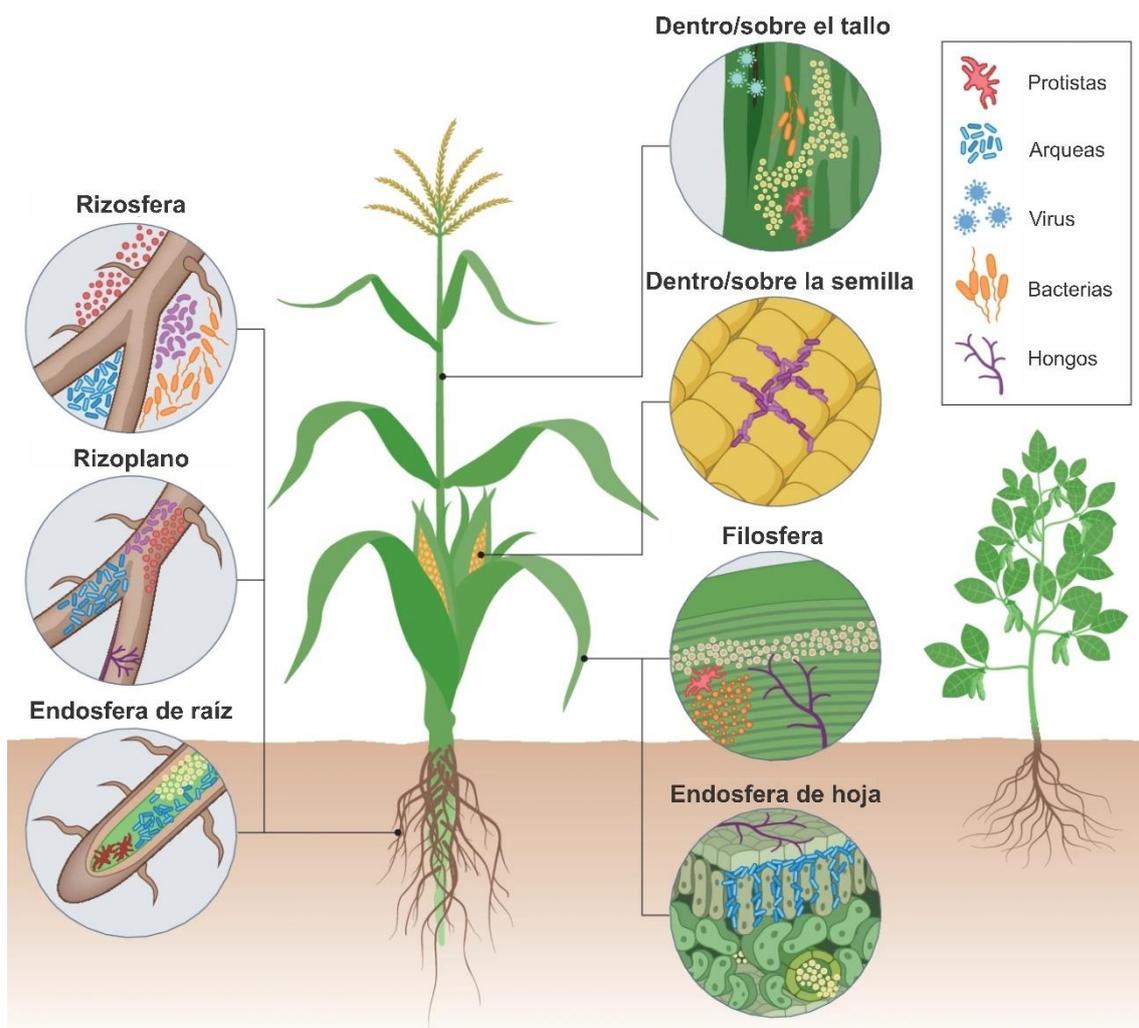


Figura I.1. Microbiomas de plantas. Los microbiomas de plantas están compuestos por bacterias, virus, arqueas, hongos y protistas, cada uno de ellos realizando funciones importantes para la comunidad. Figura adaptada de Compant *et al.* (2024).

seleccionados se encuentran bien adaptados para su vida sobre o dentro de las plantas (Trivedi *et al.*, 2020).

Los microbiomas asociados a plantas les confieren ventajas a las mismas entre las que se incluyen la tolerancia a estreses, captación de nutrientes, promoción del crecimiento y resistencia a patógenos (Compant *et al.*, 2024). Los mecanismos involucrados en la adquisición de nutrientes incluyen tanto a la simbiosis con micorrizas arbusculares, involucradas principalmente en el aumento en la absorción de agua y distintos nutrientes, como a la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (denominadas rizobios), los cuales aportan una valiosa fuente de nitrógeno. Todos estos procesos generan una mejora en la nutrición y sanidad general de la planta, resultando en aumentos en la calidad nutricional de las mismas (Trivedi *et al.*, 2020, Compant *et al.*, 2024).

I.1.2. Aplicaciones microbianas en los cultivos agrícolas

Distintos productos químicos son utilizados en los cultivos agrícolas para aumentar el rendimiento de los mismos y protegerlos de enfermedades, teniendo un rol importante debido al incremento en la demanda de alimentos a nivel mundial (Compant *et al.*, 2024). Sin embargo, el uso de estos productos genera preocupación debido a su impacto en el medio ambiente (Mosier, 2001, Smith *et al.*, 2007). Para evitar o reducir su uso, se recurre al uso de microorganismos benéficos capaces de promover el crecimiento vegetal. Los productos más utilizados funcionan como biocontroladores, biofertilizantes y bioestimulantes. Los microorganismos utilizados para biocontrol, actúan mayoritariamente contra insectos y hongos presentes en los suelos (Collinge *et al.*, 2022). Los biofertilizantes (o inoculantes) contienen microorganismos vivos en sus formulaciones y su uso mejora la fertilidad de los suelos y la absorción de nutrientes en las plantas. Los bioestimulantes son producidos a partir de distintos materiales y/o procesos, están compuestos por sustancias orgánicas e inorgánicas y pueden incluir microorganismos. Sin embargo, no proporcionan nutrientes directamente sino que estimulan los procesos de adquisición de nutrientes por las plantas (Yakhin *et al.*, 2016, Compant *et al.*, 2024). De esta manera, hay una gran variedad de productos basados en los microorganismos encontrados en la microbiota de las plantas con el fin de mejorar la sanidad general de la planta.

I.2. Biodisponibilidad de nitrógeno en los suelos: la simbiosis rizobio-leguminosa

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para los seres vivos ya que forma parte de biomoléculas esenciales como los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Para la

mayoría de las plantas, la producción de 1 kg de biomasa requiere entre 20 y 50 g de N que las raíces deben captar desde los suelos. Por lo tanto, el suministro de N que requieren las plantas suele limitar la productividad de los cultivos agrícolas (Robertson & Vitousek, 2009, Xu *et al.*, 2012). En el siglo XX, los fertilizantes se volvieron necesarios para poder abastecer de alimento a la población. El proceso Haber-Bosch fue la solución en 1908, permitiendo generar, a nivel industrial, amonio a partir de N₂ y energía. Mientras que el uso de los fertilizantes nitrogenados aumenta la productividad de los cultivos, el uso indiscriminado de éstos tiene un gran impacto en el medio ambiente (Sutton *et al.*, 2011). El exceso de nitrógeno de sistemas agrícolas genera riesgos para la calidad del aire, agua y suelos. Este exceso de N puede filtrar a las masas de agua generando la eutrofización de las mismas y afectar la calidad del agua potable destinada al consumo humano (Robertson & Vitousek, 2009, Xu *et al.*, 2012). A su vez, se liberan gases con especies reactivas de N a la atmósfera que contribuyen al efecto invernadero y por lo tanto al calentamiento global (Mosier, 2001, Sutton *et al.*, 2011). Previo al desarrollo de los fertilizantes nitrogenados sintetizados químicamente que aportaron un gran cambio en el desarrollo de los cultivos de interés agronómico, la fuente principal de nitrógeno a los sistemas agrícolas era la fijación biológica del nitrógeno (FBN) llevada a cabo durante la simbiosis entre los rizobios residentes del suelo y las plantas leguminosas.

I.2.1. Las leguminosas

La familia Fabaceae (leguminosas) es la tercera familia más grande dentro de las angiospermas y se encuentra distribuida alrededor de todo planeta con excepción de la Antártida (Doyle & Luckow, 2003, Roy *et al.*, 2020). Esta familia posee más de 20.000 especies de plantas, las cuales poseen frutos denominados vainas o legumbres. Su diversidad es tal que incluye árboles, arbustos, plantas herbáceas y enredaderas (Mathesius, 2022). Su diversidad provee una gran variedad de productos: sus semillas poseen un alto contenido de proteínas lo cual las hace importantes fuentes de alimento; se utilizan como forraje para el ganado y son implementadas para la rotación de cultivos. Una de sus características distintivas es la capacidad de establecer una simbiosis con rizobios, proceso que culmina en la formación del nódulo, órgano que se desarrolla en las raíces de las plantas, donde las bacterias sufren una serie de cambios que les permiten reducir el nitrógeno atmosférico a amonio. La mayoría de las especies de leguminosas son capaces de nodular y la interacción es específica entre la especie de la leguminosa y la cepa bacteriana (Mathesius, 2022). Esta interacción simbiótica y la capacidad de fijar N hace a las leguminosas especialmente importantes en la agricultura ya que permite introducir nitrógeno a los suelos de manera sustentable.

Debido a los aspectos nutricionales y a los cambios ambientales que genera, las leguminosas se consideran como un grupo de cultivos con grandes perspectivas a futuro. Esta familia de plantas son una gran fuente de proteína, carbohidratos, azúcares y vitaminas, teniendo grandes efectos en la salud humana (Dutta *et al.*, 2022). El uso de leguminosas en sistemas agrícolas permite aumentar la fertilidad de los suelos, mejorando la materia orgánica. En 2021, se produjeron 551 millones de toneladas de leguminosas a nivel mundial, siendo la soja la más cultivada, seguida de la arveja y el poroto (Dell'Olmo *et al.*, 2023).

En Argentina, más de 17 millones de hectáreas son sembradas con soja, siendo uno de los pilares de nuestra economía. En cuanto a leguminosas forrajeras, la más importante del país es la alfalfa. A pesar de que su cultivo ha disminuido en los últimos años, se estima que alrededor de 3 millones de hectáreas son cultivadas en el país, siendo uno de los mayores productores a nivel mundial (INTA, 2022). La alfalfa es una especie muy versátil, capaz de adaptarse a distintas condiciones climáticas y tipos de suelos. Sin embargo, es particularmente sensible a inundaciones e incapaz de crecer en suelos ácidos (Larkcom, 1980, Duke, 1983).

I.2.2. Los rizobios

Los rizobios son bacterias presentes en los suelos capaces de interaccionar simbióticamente con plantas leguminosas, utilizándose además como inoculantes para los cultivos agrícolas. Forman parte de la familia Rhizobiaceae e incluye los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Shinella*, entre otros (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015). Son un grupo diverso de bacterias Gram negativas pertenecientes a las alfa y beta proteobacterias. Pueden vivir en forma saprofítica en los suelos o dentro de los nódulos en simbiosis, donde sufren un proceso de diferenciación en bacteroides. Se considera que este cambio tan drástico en la forma de vida de los rizobios contribuyó a la evolución del tamaño de sus genomas (Poole *et al.*, 2018). En sus genomas codifican los genes involucrados en su vida como endosimbiontes: genes *nod* involucrados en la producción de moléculas señal denominadas factores de nodulación (factores nod, FN) y genes *nif* y *fix* codificando proteínas necesarias para la fijación de nitrógeno (Poole *et al.*, 2018).

Este grupo de bacterias puede contener, además de su cromosoma, uno o más plásmidos. Los plásmidos de rizobios varían en cantidad y tamaño y portan tanto genes esenciales como accesorios (Lagares *et al.*, 2015). Entre los rizobios más estudiados se encuentra *Sinorhizobium* (*syn. Ensifer*) *meliloti* 1021, que posee un cromosoma y dos plásmidos, pSymA y pSymB de 1,4 y 1,7 Mb, respectivamente. pSymA es el denominado plásmido simbiótico, ya que porta los genes *nod*, *nif* y *fix*, mientras que pSymB es

considerado un crómido, un híbrido con características de plásmido y cromosoma. pSymB porta tanto genes necesarios para la infección y la diferenciación de los bacteroides como para el crecimiento de la bacteria en vida libre (Harrison *et al.*, 2010, diCenzo *et al.*, 2013, Poole *et al.*, 2018). Por otro lado, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *Rhizobium etli* CFN42, noduladores de arveja y poroto respectivamente, poseen seis plásmidos con la mayoría de los genes necesarios para la nodulación y fijación en los plásmidos simbióticos pRL10 y p42d, respectivamente (Young *et al.*, 2006, Poole *et al.*, 2018). En algunos casos, los plásmidos simbióticos pueden transferirse por conjugación a otros rizobios, con una frecuencia de transferencia variable, confiriéndole ventajas adaptativas a las bacterias del suelo que los reciben. Sin embargo, otros rizobios llevan sus genes simbióticos en sus cromosomas, como es el caso de *Mesorhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp. (Kaneko *et al.*, 2002, Haskett *et al.*, 2016, Poole *et al.*, 2018). En el caso de *Mesorhizobium* spp. estos genes se encuentran en elementos conjugativos integrativos (ICEs por “*integrative and conjugative elements*”), capaces de transferirse a otras bacterias (Ramsay *et al.*, 2006, Poole *et al.*, 2018). En el cromosoma de *Bradyrhizobium* spp., los genes simbióticos se encuentran en regiones similares a los ICE pero no está claro si estas regiones son transmisibles (Kaneko *et al.*, 2011, Servin-Garciduenas *et al.*, 2016, Poole *et al.*, 2018).

Los rizobios son capaces de sobrevivir en los suelos, colonizar y acceder a las raíces de las plantas. Generalmente, ingresan a través de los pelos radiculares formando hilos de infección, aunque también son capaces de ingresar a través de heridas en la epidermis de la raíz (Poole *et al.*, 2018). Cuando ingresan en las raíces formando hilos de infección, se duplican hasta llegar al citoplasma de las células de la corteza, las que también sufren cambios durante el proceso (Poole *et al.*, 2018). A medida que el mismo avanza, las bacterias se diferencian en bacteroides, estado en el cual son capaces de fijar N₂ atmosférico utilizando el complejo de la enzima nitrogenasa en condiciones de concentraciones de O₂ bajas (Gage, 2004, Gibson *et al.*, 2008, Poole *et al.*, 2018).

Las condiciones del suelo suelen ser difíciles para la sobrevivencia de las bacterias, sin embargo, los rizobios son capaces de sobrevivir y competir con la microbiota del suelo incluso antes de establecer la simbiosis. La supervivencia de estas bacterias en el suelo depende de su tolerancia a las distintas condiciones de estrés y su capacidad para eliminar compuestos dañinos del suelo (Basile & Lepek, 2021).

I.3. Establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno

La fijación de nitrógeno en simbiosis es el paso final de una serie de procesos complejos entre las leguminosas y rizobios, incluyendo tanto cascadas de señalización

que inducen la expresión de genes (en la planta y en la bacteria) como la supresión de la respuesta de defensa de la planta que permite la selección del huésped (Roy *et al.*, 2020). El proceso general incluye la liberación de señales por la planta que comienza un diálogo molecular con la bacteria, permite la formación del meristema nodular y, eventualmente, forman organelas especializadas llamadas simbiosomas, cada una conteniendo uno o más bacteroides fijadores de nitrógeno (Roy *et al.*, 2020). La diferenciación del tejido de la planta en los nódulos provee un ambiente rico en nutrientes para las bacterias y con bajos niveles de oxígeno, característica fundamental para que ocurra la reducción de nitrógeno por el complejo de la nitrogenasa. La simbiosis fijadora de N es una simbiosis metabólica que se basa en el intercambio de carbono reducido por la planta y nitrógeno reducido por parte de los bacteroides.

I.3.1. Interacción temprana: flavonoides y factores de nodulación

La interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas generalmente inicia en condiciones de escasas de nitrógeno disponible, donde las leguminosas secretan metabolitos llamados flavonoides como respuesta a esta baja concentración de N. Estos metabolitos, derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona, son exudados por las raíces y actúan como señales quimiotácticas para los rizobios. El perfil de flavonoides secretados es distinto para cada planta y confieren especificidad de huésped (Roy *et al.*, 2020). Estas moléculas son capaces de interactuar con la proteína bacteriana NodD, un factor de transcripción que induce la expresión de los genes *nod*. En *S. meliloti*, dichos genes pueden ser inhibidos por los flavonoides de plantas no hospedadoras (Peck *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007). Los genes *nod* son necesarios para la producción de lipoquitooligosacáridos, denominados factores de nodulación (factores nod o FN) y poseen una estructura conservada de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina (Peters *et al.*, 1986, Lerouge *et al.*, 1990). El operón *nodABC* codifica para proteínas necesarias para la estructura principal de los FN, mientras que proteínas codificadas por otros genes *nod*, genes *noe* y genes *nol* modifican los FN, contribuyendo a la especificidad del huésped, al ser estas modificaciones reconocidas o no por la planta huésped (Figura I.2) (Long, 1996, Perret *et al.*, 2000, Jones *et al.*, 2007). Entre estas modificaciones se encuentra la adición de grupos sulfato, acetilo y metilo, entre otros (Perret *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los FN producidos por los rizobios son necesarios y suficientes para inducir el desarrollo de los nódulos en las raíces de las leguminosas, aún en ausencia de rizobios (Truchet *et al.*, 1991).

Los genes necesarios para la percepción de los FN fueron de los primeros genes en ser identificados debido a su fenotipo incapaz de nodular (Nod⁻). Por ejemplo, en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*, la ausencia del gen *MtNFP* (“*Medicago*

truncatula Nod factor perception") no permite que la planta responda. Este gen codifica para una proteína de la familia de los receptores LysM, necesaria para generar una serie de cambios transcripcionales en las raíces en respuesta a FN (Jones *et al.*, 2007). *M. truncatula* es incapaz de interactuar con *Mesorhizobium loti*, un simbiote natural de *Lotus japonicus*. Sin embargo, una versión modificada de *M. truncatula* expresando LjNFR1 y LjNFR5 ("*Nod Factor Receptor*" de *Lotus japonicus*) sí es capaz de hacerlo, expresando nodulinas tempranas e iniciando la organogénesis del nódulo, demostrando que estos receptores son esenciales para la selección del simbiote y la restricción del rango de huéspedes (Radutoiu *et al.*, 2007). En general, los FN inducen la vía común de señalización simbiótica ("*Common symbiosis-signaling pathway*"), que le permite a la planta interactuar con estos microorganismos, activando una serie de factores de transcripción que dirigen la infección y la organogénesis del nódulo (Roy *et al.*, 2020) (Figura 1.2). Llamativamente, los factores Myc, necesarios para la simbiosis con micorrizas arbusculares, también inducen esta cascada común de señalización, aunque la respuesta a nivel transcripcional es diferente (Mergaert *et al.*, 2020).

El reconocimiento y unión de los FN en la epidermis de la raíz induce respuestas que son esenciales para la invasión de la planta (Roy *et al.*, 2020). En particular, la percepción de los FN lleva a la despolarización de la membrana celular y a cambios en los flujos iónicos. Entre estos últimos, se encuentran las oscilaciones en la concentración de calcio ("*spiking*") en el núcleo de las células de la epidermis de los pelos radiculares, los cuales se encuentran asociados a cambios en la expresión de genes relacionados al desarrollo del nódulo y la infección (Charpentier & Oldroyd, 2013). Esto es seguido por la deformación de los pelos radiculares, enrulándose y atrapando las bacterias en estas estructuras. A su vez, los FN estimulan el reinicio de la mitosis de las células de la corteza de la raíz, las cuales formarán el primordio del nódulo (Jones *et al.*, 2007). Posterior al inicio de la señalización, la hidrólisis de los FN parece ser crucial tanto para la colonización e infección bacteriana como para la formación del nódulo (Cai *et al.*, 2018, Malolepszy *et al.*, 2018).

Distintas proteínas de la membrana nuclear están involucradas en la señalización de calcio en las células de la planta, incluyendo canales de calcio como *MtDMI1* ("*Does not make infections1*") y subunidades de nucleoporinas (Roy *et al.*, 2020). Otra proteína involucrada en esta señalización es la calcio-calmodulina quinasa (*MtDMI3/CCaMK*), que actúa como intermediaria entre la recepción de los FN y el desarrollo del nódulo, presuntamente como sensor de la señal proveniente de las oscilaciones de calcio. El factor de transcripción *LjCYCLOPS/INTERACTING PROTEIN OF DMI3 (MtIPD3)* (Yano *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2014) regula la expresión de genes que llevan a la nodulación. Este factor de transcripción puede ser fosforilado por CCaMK, lo que sugiere que

conecta la señalización de las oscilaciones de calcio con la transcripción genética (Singh *et al.*, 2014). NSP1 y NSP2 (“*Nodulation signaling pathway*”) son dos factores de transcripción que interaccionan formando heterodímeros necesarios para unir y activar genes en respuesta a FN (Hirsch *et al.*, 2009, Roy *et al.*, 2020).

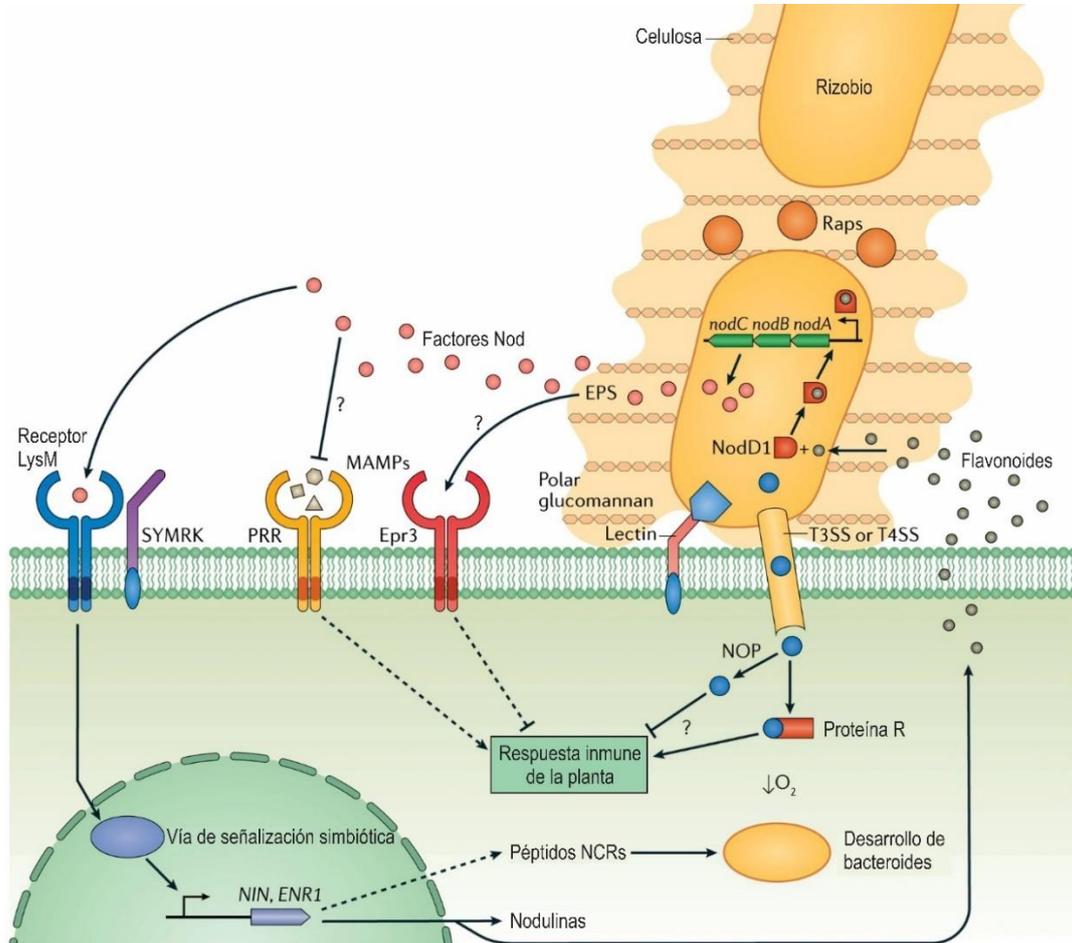


Figura I.2. Señalización entre planta y rizobio durante la simbiosis. En condiciones donde el suelo tiene bajas concentraciones de N, las raíces de las plantas liberan flavonoides, los cuales interaccionan con el factor de transcripción bacteriano NodD (“*nodulation protein*”). Este induce la transcripción de genes *nod*, que producen factores de nodulación (FN). Los FN se unen a receptores de la familia LysM formando complejos. Esta interacción activa la proteína rica en leucina tipo receptor-quinasa (SYMRK, “*leucine-rich repeat protein receptor – like kinase*”), la cual activa la vía de señalización simbiótica. Esta señalización desencadena el inicio de la formación del nódulo, incluyendo la producción de péptidos ricos en cisteína específicos de nódulos (NCRs, “*nodule cysteine-rich peptides*”), nodulinas y flavonoides. Los NCRs se producen en las leguminosas pertenecientes al clado IRLC (“*inverted repeat-lacking clade*”) e inducen la diferenciación de los bacteroides. El desarrollo de los mismos está ligado a concentraciones bajas de O₂. Durante el enrutamiento del pelo radicular producto de la señalización de los FN, las bacterias se adhieren al tejido vegetal mediante exopolisacáridos (EPS), proteínas de adhesión (Raps) y celulosa. Estos metabolitos a su vez suprimen la respuesta inmune de la planta en plantas no leguminosas, por lo tanto, se especula que se une a un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) para suprimir la respuesta asociada a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP, “*microorganism-associated molecular pattern*”). Algunas bacterias inyectan proteínas efectoras (NOPs, “*effector proteins*”) a través de sistemas de secreción tipo III (T3SS) y tipo IV (T4SS). Las NOPs pueden aumentar el rango de huésped, presumiblemente suprimiendo la respuesta de defensa de la planta, aunque también pueden unirse a la proteína R de la planta para estimular la inmunidad y restringir el rango de hospedador. Adaptado de Poole *et al.* (2018).

I.3.2. Colonización de las raíces y formación de hilos de infección

El enrollado de los pelos radiculares atrapa a los rizobios y es allí donde proliferan y forman microcolonias, generando una zona con una alta concentración de FN y exopolisacáridos (Jones *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2024). A su vez, se generan modificaciones y se degrada la pared celular de las células de la raíz, permitiendo la invasión de la planta. La colonización por parte de los rizobios es esencial para la simbiosis. Dependiendo de la planta hospedadora, los rizobios pueden invadir las células vegetales mediante invasión de pelos radiculares, formando hilos de infección (como en alfalfa o soja), o mediante invasión intercelular entre células de la epidermis (como en maní y *aeschynomene*) (Zhang *et al.*, 2024). Este último tiene dos modelos en la familia Fabaceae: el primero conocido como “*crack entry*”, donde los rizobios infectan la planta a través de heridas naturales causadas por el crecimiento de raíces laterales (Sharma *et al.*, 2020), y un segundo mecanismo, donde los rizobios penetran las raíces de células epidérmicas sanas, usualmente en la unión de dos células de la raíz o en la pared celular entre una célula de la raíz y una de la epidermis (Ibanez *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2024). En el caso de las plantas que son colonizadas mediante hilos de infección, la acumulación de FN estimula la formación de esta estructura con forma tubular, que comienza con una invaginación de la membrana plasmática y permite la entrada de las bacterias. Los FN son necesarios para la formación del hilo de infección, ya que se generan hilos de infección abortivos al utilizar FN con estructura incompleta o alterada y en casos donde la percepción de los mismos se ve interrumpida (Ardourel *et al.*, 1994). Los rizobios que se encuentran en la punta del hilo de infección se encuentran dividiéndose activamente, por lo que la invasión parece progresar con la proliferación de éstos y la síntesis de la membrana del hilo de infección (Jones *et al.*, 2007).

La producción de exopolisacáridos (EPS) es esencial en *S. meliloti* para la colonización, debido a su importancia en la interacción con la superficie de la raíz. Esta bacteria produce dos tipos de EPS: EPS I (succinoglicano) y EPS II (galactoglucano), que facilitan la formación de los hilos de infección (Jones *et al.*, 2007). El succinoglicano es el más efectivo en la mediación de los hilos de infección en *Medicago sativa* y es el único EPS que se necesita para la formación de los mismos en *M. truncatula* (Pellock *et al.*, 2000). La mutación en el gen *exoY* en esta bacteria impide que las mismas produzcan succinoglicano, por lo que no son capaces de avanzar de su estado de microcolonia e iniciar hilos de infección en la planta (Cheng & Walker, 1998). Por otro lado, un mutante en el gen *exoH* produce succinoglicano que carece de succinilo como sustituyente, generando hilos de infección abortivos, donde las bacterias continúan proliferando, pero la punta del hilo de infección no avanza (Cheng & Walker, 1998). Sin

embargo, en otras simbiosis, como la que se da entre *Vicia sativa* y *Rhizobium leguminosarum*, la estructura del EPS parece ser menos crítica para la infección (Laus *et al.*, 2005, Jones *et al.*, 2007).

En relación a la planta hospedadora, distintos genes han sido descriptos como involucrados en la formación de los hilos de infección. Mutantes en el receptor de FN, *MtNFP* (ver sección 1.3.1), son capaces de generar el enrulado de los pelos radiculares, sin embargo, forman hilos de infección abortivos (Jones *et al.*, 2007). El mutante en el gen *MtSk11* es deficiente en la proteína EIN2 (“*ethylene insensitive2*”), necesaria para la señalización por etileno (Penmetsa & Cook, 2000, Penmetsa *et al.*, 2003). Esta hormona controla la biosíntesis y señalización de otras fitohormonas en distintos estados de la simbiosis, también modulando la respuesta de defensa de la planta. La mutación de *MtSk11* muestra una proliferación de hilos de infección masiva y formación de primordios de nódulos, sin embargo, pocos de ellos se desarrollan en nódulos maduros (Roy *et al.*, 2020). Otras hormonas parecen estar involucradas en el proceso de infección por parte de los rizobios: las auxinas regulan positivamente la infección, mientras que el ácido giberélico parece ser un regulador negativo de la misma. Distintos componentes del citoesqueleto son necesarios para la reorganización del crecimiento de la punta del pelo radicular y el desarrollo del hilo de infección. El complejo de proteínas SCAR/WAVE inicia la formación de complejos de actina, dirigiendo el crecimiento celular (Yokota *et al.*, 2009). Plantas mutantes en genes relacionados a este complejo, generan hilos de infección abortivos o que se desintegran rápidamente (Roy *et al.*, 2020). Previo a la penetración por el hilo de infección, la célula de la raíz sufre una reorganización en su citoplasma, donde se forma un puente a través de la vacuola formado por células en preparación para la mitosis. Las células entran en el ciclo celular y replican sus genomas, sin embargo, este ciclo se detiene antes de entrar en la mitosis (Mergaert *et al.*, 2020).

La hormona citoquinina y la reiniciación del ciclo celular mediada por FN están involucrados en el direccionamiento de los hilos de infección a las células de la corteza. Mutantes en *MtCRE1* (“*cytokinin receptor/histidine kinase1*”) no son capaces de reiniciar la división celular de las células corticales de la raíz y generan hilos de infección abortivos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Los hilos de infección que penetran los nódulos de *M. truncatula* o *M. sativa*, deben atravesar las células del primordio del nódulo que se encuentran dividiendo. Las células adyacentes al inicio del primordio del nódulo darán lugar a la formación del meristema, que mantiene un grupo de células que se dividen activamente y que continuará creciendo durante la vida del nódulo. En estos nódulos, el hilo de infección atraviesa las capas celulares de células poliploides, que sufrieron endoreduplicación de sus genomas con ciclos de replicación de ADN sin citoquinesis

(Jones *et al.*, 2007). Este proceso es necesario para la funcionalidad de los nódulos, otorgándole una tasa de transcripción y metabolismo más alta. Los denominados nódulos determinados, como aquellos generados por *Lotus japonicus* y *Glycine max*, tienen células que proliferan, se diferencian y se convierten en senescentes de manera sincronizada, sin mantener el meristema (Mergaert *et al.*, 2006).

I.3.3. Organogénesis del nódulo

La organogénesis del nódulo depende de tres procesos simultáneos: la colonización bacteriana, el inicio de la formación del nódulo y la autorregulación del número de nódulos (AON) (Roy *et al.*, 2020). Las oscilaciones de los niveles de calcio generadas por los FN llevan a que una cascada de señalización, mediada por *MtPD3*, active el factor de transcripción NIN (“*Nodule inception*”), induciendo la formación de hilos de infección y el inicio de la formación del nódulo. NIN es también inducida por otros factores de transcripción denominados NSP1 y NSP2 (Roy *et al.*, 2020). El factor de transcripción NIN es un regulador maestro de múltiples procesos y genes que tienen efectos positivos y negativos en la organogénesis del nódulo dependiendo del estado de desarrollo del mismo (Soyano *et al.*, 2014). NIN desencadena la formación de hilos de infección y el desarrollo del primordio del nódulo al inducir la expresión de otros factores de transcripción como MtNF-YA1 (“*Nuclear transcription factor Y subunit A-1*”) (Laporte *et al.*, 2014). Al igual que NIN, el complejo del factor nuclear NF-Y controla distintos pasos de la organogénesis: MtNF-YA1 es crítico para la formación y persistencia del meristema en *M. truncatula* (Combiere *et al.*, 2006, Combiere *et al.*, 2008). En *L. japonicus*, LjNF-YA1 y LtNF-YA2 promueven la división celular de las células de la corteza (Soyano *et al.*, 2013). En *Phaseolus vulgaris*, NF-Y forma un heterotrímero que es necesario tanto para la infección y organogénesis de los nódulos, como para la selección del simbionte para una mejor eficiencia en la fijación de nitrógeno (Zanetti *et al.*, 2010, Ripodas *et al.*, 2019).

El factor de transcripción en respuesta a etileno, *ERN1*, (“*ethylene response factor required for nodulation1*”) también es necesario para la organogénesis de los nódulos de *M. truncatula* (Roy *et al.*, 2020). Tal como sucede con NIN, se induce su expresión con la cascada de señalización derivada de las oscilaciones de calcio. *ERN1* controla la expresión de los genes *ENOD11* (“*early noduline 11*”) y *ENOD12* (“*early noduline 12*”), críticos para el desarrollo de los hilos de infección. Un mutante en un gen homólogo a *ERN1*, *MtERN2*, genera nódulos funcionales pero que presentan senescencia temprana en *M. truncatula* (Cerri *et al.*, 2017).

I.3.4.A. Nódulos determinados e indeterminados

Los dos tipos de nódulos formados por las leguminosas, determinados o indeterminados, tienen distintas morfologías y la planta es quien determina qué tipo de nódulo se desarrolla (Ferguson *et al.*, 2010).

Los nódulos indeterminados poseen un meristema apical, lo que resulta en nódulos alargados con forma cilíndrica, como lo son, por ejemplo, los nódulos de alfalfa (*M. sativa*), arveja (*Pisum sativum*) y *M. truncatula*. La división celular de las células de este tipo de nódulos comienza en la capa interna de la corteza (Roy *et al.*, 2020). Dicho meristema produce continuamente células que son infectadas por bacterias. Esto hace que, cuando los nódulos son maduros, tengan una población heterogénea de bacteroides debido a la continua división celular, dando lugar a un gradiente de distintos estados de desarrollo a medida que el nódulo continúa elongándose (Ferguson *et al.*, 2010). Esta diferencia permite que se distingan distintas zonas dentro de los nódulos: el meristema del nódulo (zona I), zona de infección (zona II), la interzona entre las zonas II y III, donde las bacterias son liberadas de los hilos de infección y rodeadas por las células vegetales, la zona de fijación de N₂ (zona III) y finalmente una zona de senescencia (zona IV) (Figura I.3.B) (Ferguson *et al.*, 2010, Roy *et al.*, 2020). Para que los nódulos sean funcionales, es importante la diferenciación de algunas células del meristema, de manera que puedan albergar a las bacterias. Para ello, las células deben crecer en tamaño y endorreduplicar su ADN. En *M. truncatula*, la endorreduplicación del ADN en las células que están siendo infectadas se encuentra controlada por *MtCCS52A*, que codifica para un activador del complejo promotor de la anafase. Células mutantes en este gen no logran aumentar su tamaño ni endorreduplicar su genoma, lo que lleva a la muerte del simbionte y de la célula vegetal (Cebolla *et al.*, 1999, Vinardell *et al.*, 2003).

En cambio, los nódulos determinados suelen ser esféricos, carecen de un meristema persistente y no tienen un gradiente de desarrollo. Las primeras divisiones celulares de estos nódulos ocurren en la capa externa de la corteza, por debajo de la epidermis. En los nódulos maduros se observa una población homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, ya que la diferenciación de las células infectadas ocurre sincronizadamente y es seguida por la senescencia del nódulo a las pocas semanas (Figura I.3.A). Cuando esto sucede, nuevos nódulos se forman en las raíces más jóvenes (Ferguson *et al.*, 2010).

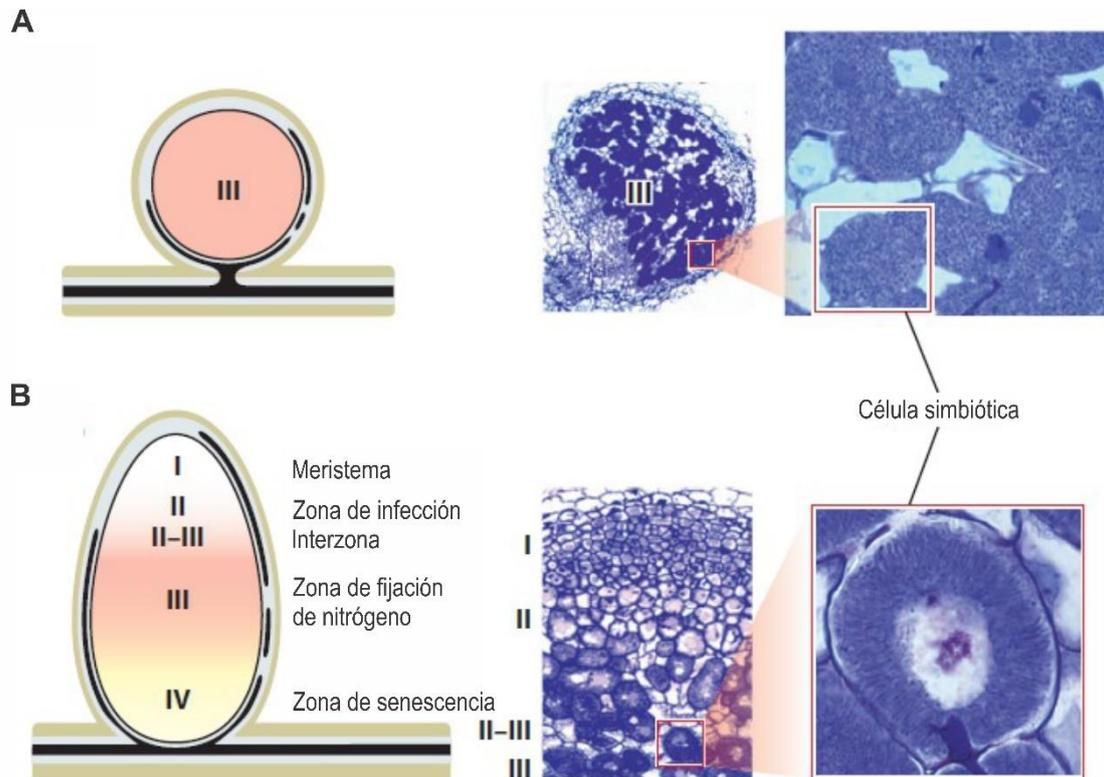


Figura I.3. Estructura de nódulos determinados e indeterminados. Esquema de las distintas zonas presentes en los dos tipos de nódulos: **A.** Nódulos determinados. **B.** Nódulos indeterminados. Se muestra una microscopía de nódulo con tinción de azul de toluidina, donde se indican las zonas y una ampliación de una célula simbiótica de cada tipo. En el tipo determinado, se observan los bacteroides redondeados y en el tipo indeterminado, se observan alargados. Adaptado de Kondorosi *et al.* (2013).

I.3.4. Formación de simbiosomas

Cuando las bacterias llegan a la capa interna de células de la corteza, son internalizadas por la membrana de la célula y establecen un nicho dentro de ella. Cada bacteria ingresa en una célula recubierta por una membrana que se origina del hilo de infección formando el simbiosoma. La bacteria crece y se divide junto con la membrana derivada de la planta, hasta que la célula vegetal se encuentra llena de miles de simbiosomas, cada uno de ellos con una o pocas bacterias (Figura I.4) (Roth & Stacey, 1989, Jones *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2020). La proteína DMI2 que se localiza en los hilos de infección y en las membranas de los simbiosomas, es necesaria para la liberación de las bacterias en los simbiosomas y el desarrollo de los mismos (Limpens *et al.*, 2005). El gen *MtHAP2-1* que codifica para un factor de transcripción también es necesario para la liberación de las bacterias de los hilos de infección (Combiere *et al.*, 2006). En cuanto a la bacteria, se ha demostrado que el mutante de *S. meliloti* en el gen *hemA*, que afecta la biosíntesis del grupo hemo no puede ser liberado de los hilos de infección (Dickstein *et al.*, 1991, Jones *et al.*, 2007).

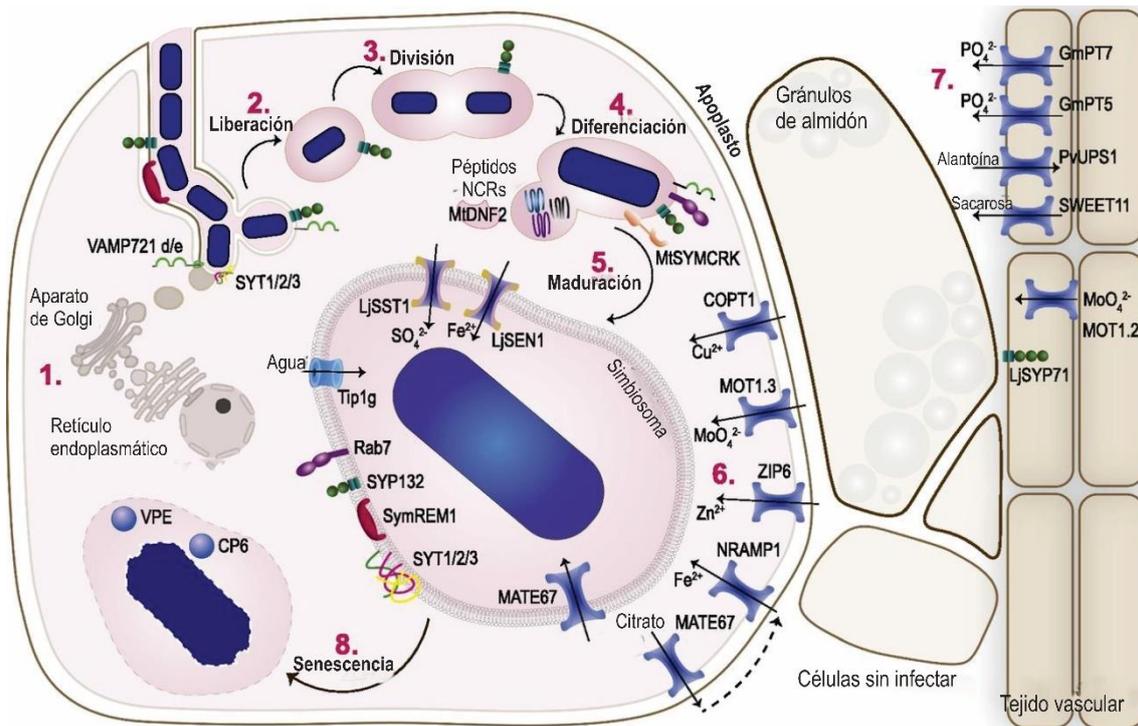


Figura I.4. Formación del simbiosoma. Las bacterias son liberadas en la célula huésped en “gotas” de infección (1) derivadas de depósitos del aparato de Golgi (2). Una vez liberadas, las bacterias se dividen (3) y se diferencian (4). Los simbiosomas maduros poseen múltiples transportadores en la membrana junto con otras proteínas (6) que son esenciales para la biogénesis de la membrana del simbiosoma durante la maduración del mismo (5). Otros transportadores en la membrana celular de los tejidos vasculares (7) son importantes para el metabolismo del bacteroide y una fijación de nitrógeno eficiente antes de que el simbiosoma inicie el proceso de senescencia (8). Adaptado de Roy *et al.* (2020).

I.3.5. Diferenciación bacteriana: determinantes bacterianos y de la planta

Una vez que los rizobios se encuentran dentro de los simbiosomas, deben sobrevivir y diferenciarse en bacteroides, la forma fijadora de nitrógeno de estas bacterias. Distintos factores, tanto de la bacteria como de la planta, son necesarios para esta diferenciación (Jones *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2020). En leguminosas como *M. truncatula* y *M. sativa*, pertenecientes al clado invertido que carece de repeticiones IRLC (“*inverted repeat-lacking clade*”), la diferenciación de los bacteroides implica una serie de cambios en el tamaño y forma (elongación), en el contenido de ADN (endorreduplicación) y en la pérdida de viabilidad en vida libre. El aumento en la cantidad de ADN ayudaría a que las bacterias tengan un metabolismo más rápido y puedan mantener la fijación de nitrógeno (Mergaert *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007). Esta diferenciación es acompañada, y en parte controlada, por una reducción en la concentración de oxígeno en las células vegetales que permite la actividad del complejo de la nitrogenasa (Roy *et al.*, 2020). Esto es posible gracias al control de la difusión de gases en el nódulo y a la presencia de leghemoglobinas, que unen y transportan el oxígeno en las células vegetales (Ott *et al.*, 2005).

En nódulos indeterminados, el proceso de diferenciación terminal que sufren los bacteroides se encuentra controlado por péptidos ricos en cisteína específicos de nódulos, NCRs (“*nodule specific cystein-rich peptides*”), de entre 30 y 70 aminoácidos, que son dirigidos hacia los simbiosomas donde inducen la diferenciación bacteriana (Pan & Wang, 2017). Estos péptidos son moléculas similares a las defensinas, péptidos antimicrobianos encontrados en eucariotas (Mergaert *et al.*, 2003). El genoma de *M. truncatula* posee más de 700 NCRs que se expresan de manera secuencial durante las etapas de morfogénesis del nódulo y desarrollo de los bacteroides, estos péptidos a su vez presentan distintos perfiles de expresión en las distintas zonas del nódulo (Guefrachi *et al.*, 2014, Maroti & Kondorosi, 2014, Roux *et al.*, 2014, Pan & Wang, 2017). A pesar de que la secuencia de estos péptidos es variada, suelen tener entre 4 y 6 residuos de cisteína espaciados regularmente, los cuales forman puentes disulfuro entre ellos. Los NCRs poseen distintos puntos isoeléctricos, sugiriendo que tienen diversas funciones en distintas condiciones, siendo importante que los péptidos catiónicos tienden a tener una mayor actividad que aquellos neutros o aniónicos (Van de Velde *et al.*, 2010, Mikulass *et al.*, 2016, Montiel *et al.*, 2017, Pan & Wang, 2017). Para procesar los NCRs, en *M. truncatula* se ha identificado la proteína DNF1 (“*defective in nitrogen fixation 1*”), la cual codifica para una peptidasa que digiere los NCRs quitándoles el péptido señal que poseen y permitiendo su direccionamiento al simbiosoma. Mutantes en esta proteína no procesan los NCRs, por lo que no inducen la diferenciación y no fijan nitrógeno, sin embargo, la infección y organogénesis son normales (Van de Velde *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010). Satgé *et al.* (2016) describieron una metilasa de ADN (DEMETER, *MtDME*) necesaria para la maduración de los NCRs, implicada en la endorreduplicación, elongación y fijación de nitrógeno de los bacteroides. El estado redox de los NCRs también parece ser importante para la diferenciación de los bacteroides. Se observó que la tiorredoxina s1 (Trx s1), necesaria para la diferenciación de los bacteroides, interactuaba *in vitro* con NCRs y era capaz de reducirlos (Alkhalifioui *et al.*, 2008, Pan & Wang, 2017, Ribeiro *et al.*, 2017).

En *M. truncatula*, el péptido NCR247 se expresa en la zona de infección y en la interzona, donde se detiene la división celular y las bacterias se elongan (Farkas *et al.*, 2014). Se ha demostrado que interactúa con proteínas de la bacteria como la chaperona GroEL1, esencial para el desarrollo de los bacteroides, y con FtsZ, involucrada en la división celular (Bittner *et al.*, 2007, Farkas *et al.*, 2014). Dentro de los mutantes estudiados que no fijan nitrógeno, se encuentran los mutantes *dnf4* y *dnf7*, los cuales codifican para los NCR211 y NCR169, respectivamente. Estos mutantes presentan nódulos pequeños y blancos, sin FBN (Pan & Wang, 2017). Sin embargo, tienen distinto impacto en el desarrollo de los bacteroides: NCR211 se expresa principalmente en la

zona de infección y la interzona, siendo necesario para la viabilidad de los bacteroides dentro de los simbiosomas (Kim *et al.*, 2015); NCR169 se expresa exclusivamente en la interzona y en la zona de fijación y sería necesario para la supervivencia de las bacterias ante los grandes cambios que sufren en la interzona II-III (Horvath *et al.*, 2015, Pan & Wang, 2017). Otro rol que cumplen los NCRs es el de controlar la especificidad de la simbiosis. *NSF1* y *NSF2* de *M. truncatula* A17, dos NCRs descritos en esta planta, promueven la muerte celular y senescencia temprana de los nódulos infectados por *S. meliloti* Rm41. Sin embargo, otros rizobios son capaces de establecer una simbiosis efectiva en esta planta, demostrando que estos péptidos otorgan una ventaja a la planta relacionada a la selección de su huésped (Wang *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2017).

En cuanto a los determinantes bacterianos, pocos genes han sido descritos como necesarios para el desarrollo y supervivencia de los bacteroides. Entre ellos se encuentra *bacA* de *S. meliloti*, que codifica para un transportador tipo ABC que demostró estar implicado en la protección de los bacteroides contra los NCRs tanto dentro de los nódulos como en vida libre (Haag *et al.*, 2011). Esto lo llevaría a cabo importando los NCRs de manera que no se encuentren en contacto con la membrana plasmática de la bacteria, que es donde suelen interactuar los péptidos antimicrobianos (Marlow *et al.*, 2009, Haag *et al.*, 2011, Pan & Wang, 2017). Recientemente, se describieron peptidasas bacterianas involucradas en la respuesta a NCRs: HrrP y SapA (Price *et al.*, 2015, Benedict *et al.*, 2021). HrrP (“*host range restriction peptidase*”) se identificó en el plásmido pHB800 de *S. meliloti* B800. Además de ser capaz de digerir NCRs *in vitro*, la presencia de este gen en el genoma bacteriano genera nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno en *M. truncatula* A20, no así en *M. truncatula* A17 (Price *et al.*, 2015). El fenotipo generado por la expresión de esta peptidasa depende tanto del genoma de la bacteria como aquel de la planta huésped (Wendlandt *et al.*, 2022). Cerca del 20% de los aislamientos de *S. meliloti* presentan el gen *hrrP*. Durante la búsqueda de homólogos a *hrrP*, se determinó que *sapA* (“*symbiosis associated peptidaseA*”), presente en *S. meliloti* 1021, genera defectos en la simbiosis únicamente cuando ésta se sobreexpresa en los bacteroides, disminuyendo la fijación de nitrógeno. Esta peptidasa también presenta actividad *in vitro* contra NCRs (Benedict *et al.*, 2021).

I.3.6. Fijación biológica de nitrógeno

Una vez que los bacteroides se encuentran en el simbiosoma, las concentraciones de oxígeno son bajas y se han diferenciado, expresan los genes necesarios para la fijación de nitrógeno. Una cascada de señalización detecta los bajos niveles de oxígeno en los nódulos y controla tanto la expresión de proteínas pertenecientes al complejo de la nitrogenasa como también aquellas necesarias para la generación de la energía que

requiere este proceso. El sistema de dos componentes FixL/FixJ, el factor de transcripción NifA y el factor σ^{54} , son algunos de los encargados de regular el proceso siendo responsables de la mayoría de los cambios a nivel de expresión de genes y proteínas que se dan durante la diferenciación (Figura I.5) (Jones *et al.*, 2007). En *S. meliloti*, la proteína que detecta las bajas concentraciones de oxígeno es FixL, la cual inicia una cascada de fosforilación que activa a la proteína reguladora FixJ. Este regulador induce FixK, una proteína reguladora de la FBN, la cual induce, a su vez, la expresión de distintos operones como *fixNOPQ* y *fixGHIS* (Poole *et al.*, 2018). Estos operones codifican para una oxidasa terminal crítica para la respiración microaeróbica de los rizobios (Udvardi & Poole, 2013). El principal regulador de los genes *nif* en *S. meliloti* es *nifA*, que también es parcialmente regulado por FixK y, a su vez, regula la expresión del operón *fixABCX-nifAB*. El operón *fixABCX* codifica para un complejo proteico que transfiere electrones a flavodoxinas o ferredoxinas. NifA regula la expresión del factor σ^{54} , encargado de inducir la expresión de los genes *nifHDKE* que codifican para el complejo de la nitrogenasa, la enzima encargada de reducir el N_2 atmosférico a amonio (Figura I.5) (Dixon & Kahn, 2004).

El proceso de fijación de nitrógeno necesita de un ambiente microaeróbico para la funcionalidad del complejo de la nitrogenasa. En términos del metabolismo bacteriano, esto implica que los rizobios deben realizar la respiración en muy bajas concentraciones de oxígeno para prevenir la inactivación de la nitrogenasa (Udvardi & Poole, 2013). Esto se logra con la presencia de leghemoglobinas y un balance redox en los bacteroides. Las leghemoglobinas son las proteínas más abundantes en los nódulos otorgándoles el color rosado que poseen y son cruciales para la FBN. Estas poseen grupos hemo que unen el O_2 en el citoplasma y lo transfieren de manera rápida a las mitocondrias y los bacteroides (Udvardi & Poole, 2013). La respiración bacteriana le otorga a la nitrogenasa 16 moléculas de ATP y 8 electrones que son necesarios para reducir una molécula de N_2 a dos moléculas de amonio (Poole & Allaway, 2000, Jones *et al.*, 2007). Un cofactor necesario para la actividad de la nitrogenasa es el homocitrato, el cual es un ligando del cofactor FeMo de la nitrogenasa (Hakoyama *et al.*, 2009). La mayoría de los rizobios no puede sintetizarlo ya que no poseen el gen *nifV*, por lo que dependen de la síntesis de este cofactor por parte de la planta, evidenciando otra manera en la cual la planta controla la FBN (Hakoyama *et al.*, 2009, Udvardi & Poole, 2013, Poole *et al.*, 2018).

Las plantas le otorgan a los bacteroides compuestos dicarboxílicos, como malato, succinato y fumarato, que son utilizados como fuentes de carbono. Estos son internalizados mediante el sistema Dct ("*dicarboxylate transport*") (Figura I.5). La actividad de las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) aumenta en los bacteroides y, sin embargo, estos producen grandes cantidades de polihidroxibutirato

(PHB), el cual se genera cuando el acetil-CoA se metaboliza en condiciones bajas de O_2 en lugar de entrar al TCA (Terpolilli *et al.*, 2016, Poole *et al.*, 2018). La síntesis de PHB parece ser importante para la FBN en *S. meliloti*, no así su degradación, lo que sugiere que este compuesto actúa como almacenamiento de compuestos carbonados reducidos (Wang *et al.*, 2007, Udvardi & Poole, 2013). A cambio de los compuestos carbonados, los bacteroides no asimilan el amonio y lo secretan a través de canales que se encuentran en la membrana peribacteroidal (Jones *et al.*, 2007, Udvardi & Poole, 2013). El ciclo glutamina sintetasa - glutamato sintetasa (GOGAT) es el encargado de asimilar el amonio secretado por los bacteroides en forma de aminoácidos (Roy *et al.*, 2020). En *M. truncatula*, los principales aminoácidos exportados de los nódulos son glutamina y asparagina (Smith & Atkins, 2002, Roy *et al.*, 2020).

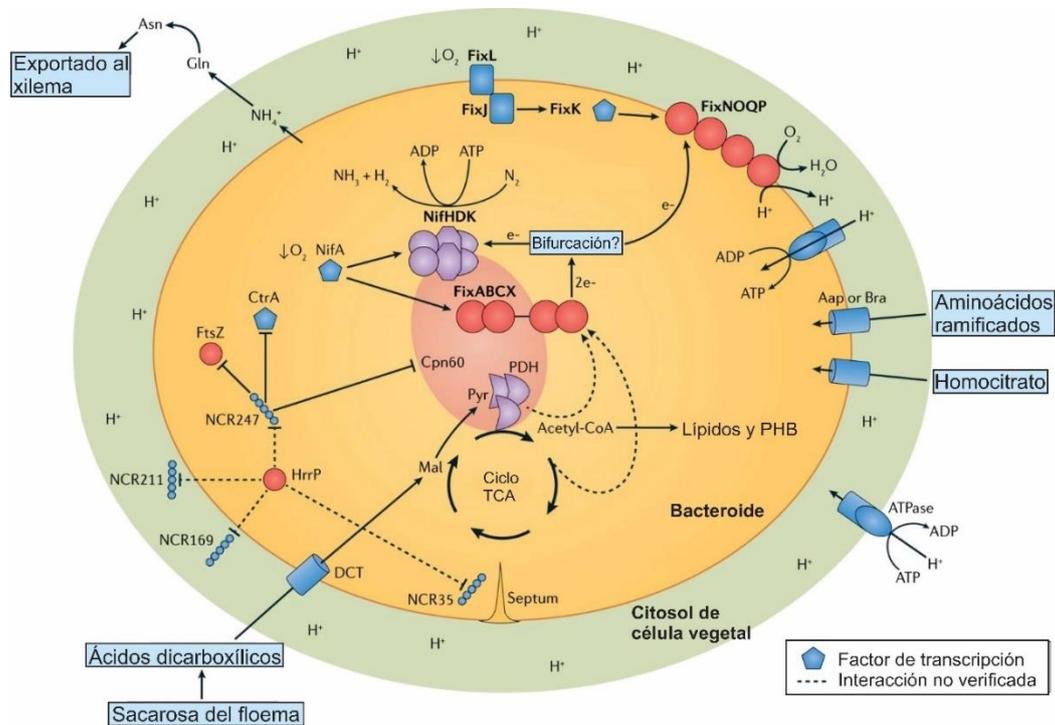


Figura I.5. Intercambio de nutrientes y regulación del desarrollo del bacteroide. El O_2 regula el desarrollo del bacteroide a través de dos circuitos. El primero, involucra el sistema FixLK, que induce la expresión de *fixNOPQ*. El segundo utiliza el regulador transcripcional *NifA*, que induce *nifHDK* (que codifican para la enzima nitrogenasa) y autoinduce *fixABCX-nifAB*. Este circuito en *S. meliloti* se encuentra superpuesto por la regulación parcial de este segundo sistema por parte de *FixK*. *FixABCX* codifica para un complejo distribuidor de electrones. La piruvato deshidrogenasa (PDH), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa podrían formar un complejo con *FixABCX* para lograr la transferencia de electrones o el NAD(P)H podría proveer los electrones directamente. *FixNOQP* es un aceptor terminal de electrones, necesario en condiciones de O_2 limitado. El O_2 bajo limita el ciclo TCA, generando que el acetil-CoA se utilice para producir lípidos y polihidroxibutirato (PHB). La peptidasa *HrrP* degradaría los NCRs, cambiando la especificidad del hospedador. La principal chaperonina de los bacteroides, *Cpn60*, podría interactuar con múltiples proteínas incluida PDH. *Aap*, permeasa de aminoácidos; *Bra*, permeasa de aminoácidos; *CtrA*, regulador de la respuesta del ciclo celular; *DCT*, transportador de dicarboxilatos; *FixJ*, regulador de respuesta transcripcional; *FixK*, proteína reguladora de la fijación de N_2 ; *FixL*, histidina quinasa receptora; *FtsZ*, proteína de la división celular; *Mal*, malato; *Pyr*, piruvato. Adaptado de Poole *et al.* (2018).

I.3.8. Senescencia y respuesta de defensa

La senescencia del nódulo permite el reciclado de nutrientes y puede ser iniciada tanto por factores de desarrollo como por factores externos, tales como la escasez de agua o niveles altos de nitrato en los suelos (Roy *et al.*, 2020). En primer lugar, los bacteroides se lisan dentro de los simbiosomas durante la senescencia relacionada al envejecimiento del nódulo y luego muere la célula vegetal infectada (Van de Velde, 2006). Análisis mediante microscopía de nódulos ya senescentes, a 35 y 61 días post inoculación, han detectado diferencias morfológicas entre las distintas células senescentes del nódulo (Figura I.6) (Van de Velde, 2006). Se identificaron tres tipos de células senescentes en *M. truncatula* (tipo I, II y III), cada una con características morfológicas distintas (Figura I.6). Generalmente, esta senescencia se encuentra controlada por factores de transcripción e involucra proteasas, lipasas y transportadores que exportan los productos de estas degradaciones (Schippers *et al.*, 2015, Roy *et al.*, 2020). Distintos genes se han caracterizado con relación a la senescencia del nódulo, como el factor de transcripción MtNAC969, el cual actúa suprimiendo la senescencia del nódulo al controlar la expresión de genes que codifican para cisteín proteasas (CP) (de Zelicourt *et al.*, 2012). MtCP6 y MtVPE (“*vacuolar processing enzyme*”), dos CP descritas, se localizan en la membrana del simbiosoma, sugiriendo que están involucradas en la degradación del mismo (Perez Guerra *et al.*, 2010, Pierre *et al.*, 2014, Roy *et al.*, 2020).

Habitualmente, los fenotipos de nódulos con respuesta de defensa activada son similares a aquellos donde los nódulos son senescentes. Un ejemplo es la mutación de la proteína MtSNARP2 (“*small nodulin acidic RNA binding protein 2*”), la cual genera una respuesta de defensa que muestra alteraciones en la corteza del nódulo. En este caso, los nódulos comienzan el proceso de senescencia tempranamente sin acumular pigmentos marrones, los cuales son asociados a la respuesta de defensa de la planta.

La interferencia en el desarrollo de la simbiosis fijadora de nitrógeno en cualquier paso genera una respuesta de defensa que desencadena la senescencia. Dos mutantes con fenotipo Fix⁻, MtDNF2 (“*does not fix 2*”) y MtSymCRK (“*symbiotic cystein rich receptor-like kinase*”), no se encuentran directamente implicados en ninguna respuesta de defensa, sin embargo muestran nódulos de color marrón, con marcadores de defensa inducidos, sin diferenciación de los bacteroides y, por lo tanto, sin fijación de nitrógeno (Bourcy *et al.*, 2013, Roy *et al.*, 2020).

Durante la interacción simbiótica, factores bacterianos pueden inducir como suprimir la respuesta de defensa de la planta (Mithofer, 2002). Los factores microbianos que disparan la respuesta inmune de la planta se clasifican en dos categorías:

inductores generales o inductores específicos (Figura I.2) (Abramovitch *et al.*, 2006). Los inductores generales incluyen flagelinas, proteínas de choque térmico, quitinas y lipopolisacáridos, que suelen estar presentes en múltiples bacterias permitiendo una respuesta general basal a la infección bacteriana (Abramovitch *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007). Ejemplos de este tipo de respuesta incluyen el aumento de pH extracelular, la producción de etileno, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la síntesis de compuestos fenólicos e incluso la activación de cascadas de señalización y cambios transcripcionales (Abramovitch *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007). Por otro lado, los inductores específicos incluyen proteínas efectoras inyectadas en las células vegetales mediante sistemas de secreción tipo 3 por parte de patógenos (Figura I.2). Estas causan respuestas más extremas y más daño a los tejidos que las respuestas de defensa basales (Abramovitch *et al.*, 2006). Los receptores LysM se encuentran muy conservados en plantas y presentan varias copias de estos genes en cada especie, esto le permite a la planta distinguir de efectores secretados por patógenos, como puede ser la quitina por parte de los hongos, o de FN, que son reconocidos por ese tipo de receptores (Jones *et al.*, 2007, Limpens *et al.*, 2015, Miyata *et al.*, 2016, Poole *et al.*, 2018).

La respuesta de defensa de la planta también se encuentra involucrada en el control del número de nódulos que se forman en las raíces. Esto se lleva a cabo mediante una señalización que es antagonista a la generada en respuesta a los FN y se encuentra mediada por las hormonas etileno y ácido jasmónico. Estas hormonas también están involucrados en la respuesta de defensa en otras interacciones entre plantas y microorganismos (Abramovitch *et al.*, 2006, Sun *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007).

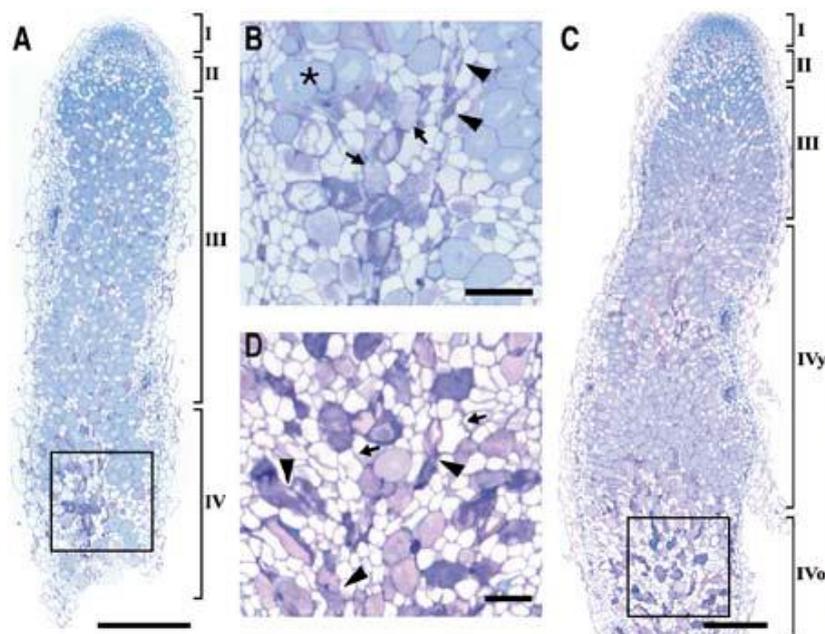


Figura I.6. Análisis de nódulos senescentes en *M. truncatula*. **A.** Nódulos de 35 dpi infectados con *S. meliloti* teñidos con azul de toluidina. **B.** Ampliación del rectángulo de A., el asterisco señala a la célula con bacteroides diferenciados fijadores de nitrógeno, las flechas y triángulos indican células senescentes de tipo I y II, respectivamente. **C.** Nódulos de 61 dpi con zonas jóvenes y zonas senescentes. **D.** Ampliación del rectángulo de C., donde los triángulos y flechas indican células senescentes de tipo II y III, respectivamente. La escala se indica como una barra negra en cada imagen: A y C equivale a 500 μm ; B y D 100 μm . Imagen tomada de Van de Velde *et al.* (2006).

I.4. Estudio de la simbiosis *Rhizobium* – *Medicago*

Siendo la alfalfa una leguminosa de gran importancia a nivel mundial, el estudio de la simbiosis con rizobios es esencial para optimizar la FBN y por lo tanto maximizar la producción de los cultivos agrícolas. La leguminosa modelo para el estudio de esta simbiosis, como ya se mencionó anteriormente, es *M. truncatula*. Tiene la particularidad de tener un genoma más pequeño que el de *M. sativa* (Blondon *et al.*, 1994). El genoma de *M. truncatula* ha sido secuenciado (Tang *et al.*, 2014, Pecrix *et al.*, 2018) y, además, numerosos transcriptomas y proteomas de esta planta han sido reportados, incluyendo también caracterización funcional de distintos genes y mutantes con diferentes fenotipos simbióticos (Capela *et al.*, 2006, Durgo *et al.*, 2015, Lang & Long, 2015, Marx *et al.*, 2016, Mergaert *et al.*, 2020, Roy *et al.*, 2020). Esta planta también es capaz de interactuar con micorrizas arbusculares, por lo que permite el estudio de dos simbiosis distintas (Krajinski & Frenzel, 2007). La genómica comparativa permite extrapolar los conocimientos obtenidos a otras leguminosas que también poseen interés agronómico, como soja o poroto.

I.4.1. Estudio de la expresión genética durante la simbiosis

El estudio de la expresión de genes en los nódulos ha permitido identificar una gran cantidad de genes involucrados en el proceso de formación del nódulo, en su

mayoría mediante genética reversa. Para el estudio de la formación de nódulos, se ha utilizado en mayor medida *M. truncatula*, estudiando desde la expresión génica en respuesta a FN hasta el desarrollo de nódulos maduros (Maunoury *et al.*, 2010, Roux *et al.*, 2014, Jardinaud *et al.*, 2016, Mergaert *et al.*, 2020). La formación de los nódulos está acoplada a un gran cambio en la transcripción de genes, involucrando tanto activación como represión de la expresión génica de cientos de genes. A pesar de que la nodulación está controlada por la vía común de señalización simbiótica, los cambios transcripcionales dentro del nódulo son completamente distintos de aquellos generados en otros procesos, como por ejemplo aquellos relacionados a la simbiosis con micorrizas, a pesar de estar regulados por la misma vía de señalización (Mergaert *et al.*, 2020). Esto resalta la importancia y singularidad que tiene el estudio de la expresión génica en los nódulos.

Se han realizado una gran cantidad de estudios transcriptómicos de nódulos de *M. truncatula*, utilizando tanto nódulos enteros como realizando una disección de estos (Capela *et al.*, 2006, Maunoury *et al.*, 2010, Roux *et al.*, 2014, Mergaert *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos han permitido establecer la idea de que las células simbióticas de nódulos son un tipo particular de célula, con necesidades complejas tanto para su formación como para su mantenimiento. Se han descrito dos grandes cambios en el transcriptoma de las células vegetales que regulan una gran parte de los genes específicos de nódulos y están relacionados a dos procesos: el primero a la maduración de la célula simbiótica y el segundo a la diferenciación bacteriana (Maunoury *et al.*, 2010). Mediante diferentes estudios genéticos se han determinado alrededor de 200 genes necesarios para la simbiosis fijadora de nitrógeno en leguminosas como han compilado recientemente por Roy *et al.* (2020). La figura I.7 muestra distintos genes estudiados en leguminosas en diferentes estadios de la simbiosis, agrupados por la etapa en la cual están involucrados.

Los bacteroides también sufren de una reprogramación transcripcional durante su maduración, induciendo la expresión de una gran cantidad de genes, como aquellos necesarios para la fijación de nitrógeno y funciones accesorias. La regulación y expresión en un determinado momento de estos genes parece ser particularmente importante, ya que se observó que la mutación de ciertos genes que presentaban una mayor expresión dentro de los bacteroides maduros no generó cambios en su fenotipo simbiótico (Karunakaran *et al.*, 2009, Lamouche *et al.*, 2018, Mergaert *et al.*, 2020).

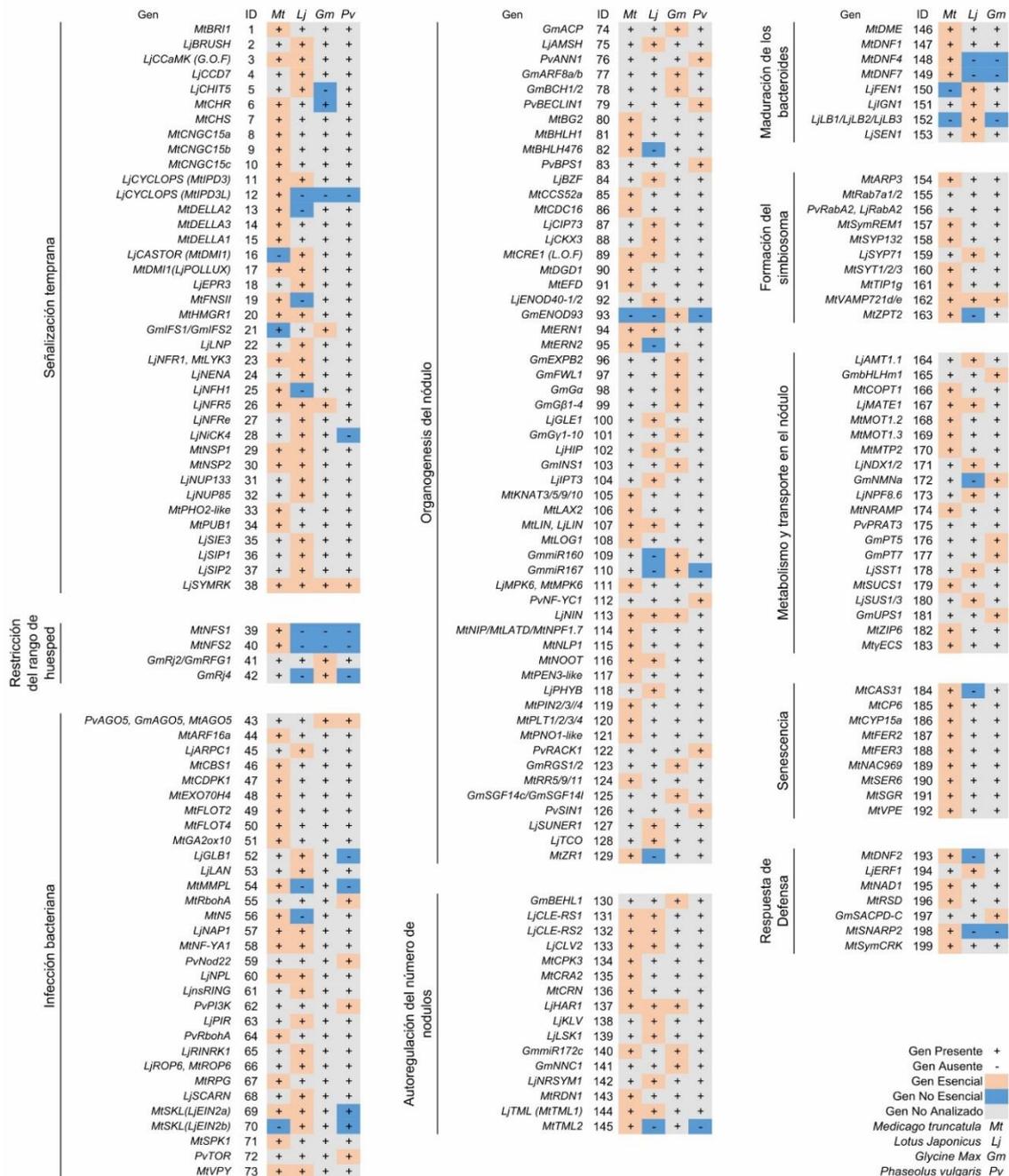


Figura I.7. Comparación de genes de la simbiosis fijadora de nitrógeno en diferentes especies. Presencia o ausencia de genes ortólogos se indica con + o -. El requerimiento para la simbiosis se especifica por color: coral (esencial), celeste (no esencial), gris (no analizado). ID, número identificador. Los datos se basan en artículos publicados y, si se encuentra disponible, secuencias que se encuentran en repositorios públicos. Adaptado de Roy *et al.* (2020).

El simbiote modelo utilizado con *M. truncatula* es *Sinorhizobium meliloti*, el cual genera nódulos eficientes, con bacterias diferenciadas en bacteroides fijadores de nitrógeno. Las plantas inoculadas con este rizobio en medio libre de nitrógeno presentan nódulos alargados y rosados, con su parte aérea de la planta de aspecto sano, característico de una planta bien nutrida. Sin embargo, no todos los rizobios capaces de nodular el género *Medicago* establecen este tipo de simbiosis eficiente. Se ha reportado la presencia de bacterias del género *Rhizobium* aisladas de la rizósfera de *M. sativa* en

suelos ácidos que son capaces de nodular alfalfa en estas condiciones, sin embargo, presentan una simbiosis ineficiente con bajos niveles de FBN (Del Papa *et al.*, 1999).

I.4.2. *Rhizobium favelukesii* LPU83

Años atrás, se caracterizó una colección de rizobios noduladores de alfalfa de los suelos de Argentina y Uruguay (Del Papa *et al.*, 1999, Wegener *et al.*, 2001), donde se detectaron aislamientos pertenecientes al género *Rhizobium* con tolerancia a la acidez que eran similares a rizobios aislados en Oregon, Estados Unidos (Eardly *et al.*, 1985). Dentro de esta colección, se caracterizó al aislamiento LPU83, que finalmente se determinó pertenecía a una nueva especie denominada *Rhizobium favelukesii* (Torres Tejerizo *et al.*, 2016). *R. favelukesii* LPU83 tiene un amplio rango de huésped: es capaz de nodular distintas especies de los géneros *Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella* y las especies *Leucaena leucocephala* y *Phaseolus vulgaris* (poroto) (Del Papa *et al.*, 1999, Wegener *et al.*, 2001). También se determinó que esta bacteria es altamente competitiva en la nodulación de alfalfa en suelos ácidos (Segundo *et al.*, 1999). Sin embargo, presenta niveles bajos de fijación de nitrógeno, formando nódulos pequeños, redondeados y sin el característico color rosado (Wegener *et al.*, 2001). Debido a su capacidad de crecer en suelos ácidos, los mecanismos de resistencia a la acidez que presenta han sido estudiados para esta bacteria en vida libre (Nilsson *et al.*, 2019, Nilsson *et al.*, 2020).

R. favelukesii LPU83 posee, además de su cromosoma (4,19 Mpb), cuatro plásmidos: pLPU83a (0,15 Mpb), pLPU83b (aproximadamente 0,75 Mpb), pLPU83c (0,76 Mpb) y pLPU83d (1,9 Mpb) (Wibberg *et al.*, 2014). El plásmido pLPU83b es el denominado plásmido simbiótico al contener el *cluster* de genes necesarios para la nodulación (Torres Tejerizo *et al.*, 2011). Si bien se conocen las secuencias que lo componen, no se encuentra completamente cerrado. pLPU83b es un plásmido de tipo movilizable al ser capaz de transferirse por conjugación, aunque esto ocurre únicamente cuando pLPU83a está presente (Torres Tejerizo *et al.*, 2010). La transferencia de este plásmido a una cepa de *S. meliloti* curada de su plásmido simbiótico (Sma818R) restaura el fenotipo nodulador de la cepa, pero mantiene los niveles de fijación de nitrógeno bajos como en los nódulos de LPU83 (Torres Tejerizo *et al.*, 2010). pLPU83d es considerado un crómido, con características tanto de plásmido como de cromosoma, mientras que pLPU83a y pLPU83c son plásmidos accesorios (Wibberg *et al.*, 2014, Castellani *et al.*, 2019). Los análisis filogenéticos de genes cromosomales mostraron que los rizobios tipo Oregon tienen similitudes con aquellas bacterias noduladoras de poroto (Bailly *et al.*, 2007, Torres Tejerizo *et al.*, 2011), siendo *R. etli* y *R. leguminosarum* especies cercanas (Figura I.8) (Tesis doctoral Dr. Torres Tejerizo).

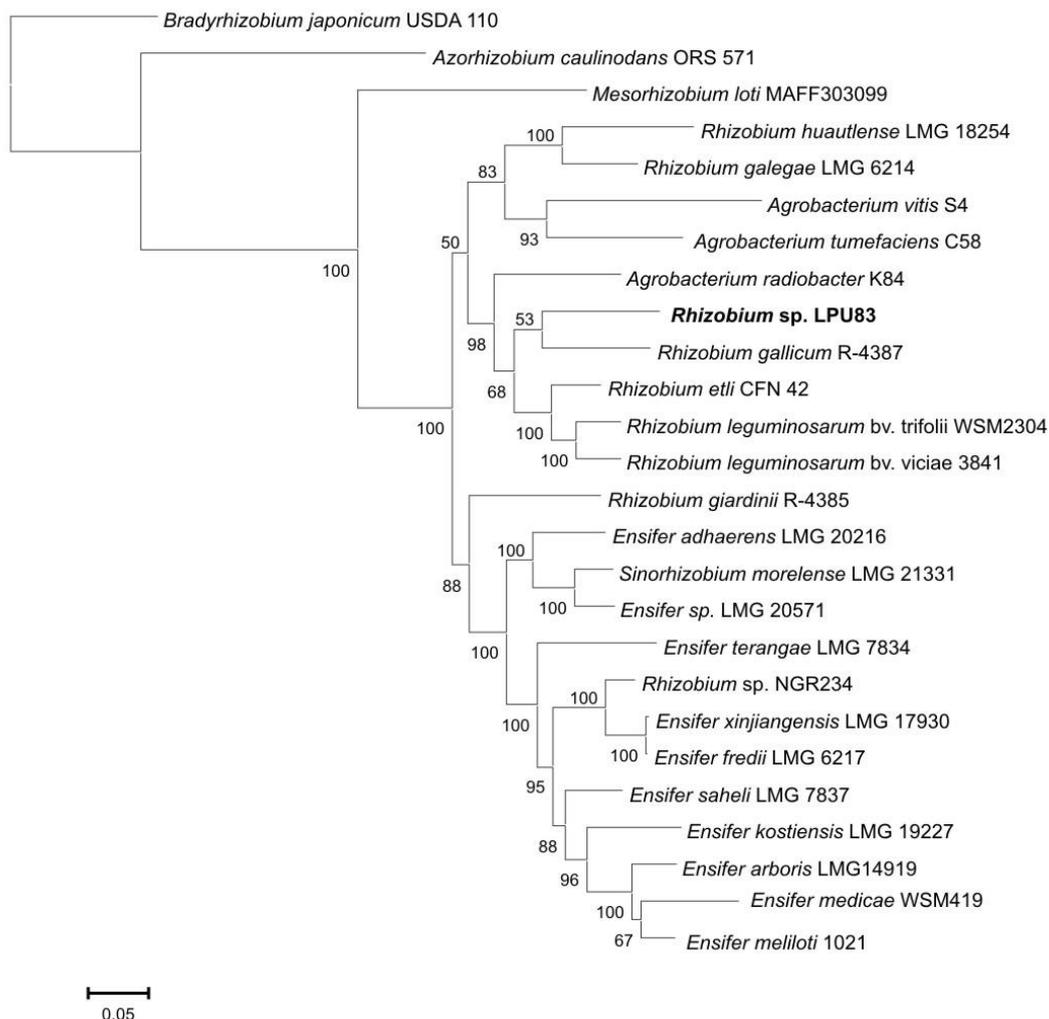


Figura I.8. Análisis filogenético del *R. favelukesii* LPU83. Reconstrucción filogenética a través del uso de los genes *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *dnaK*, *glnA*, *gltA* y *thrC* concatenados. El análisis de la figura fue realizado por el método de Máxima verosimilitud. Los valores de *bootstrap* mayores a 50 se encuentran indicados en los nodos. La barra indica 0,05 sustituciones/sitio. Tomado de Torres Tejerizo *et al.* (2011).

Como ya se mencionó, *R. favelukesii* es capaz de nodular distintas leguminosas, pero en ninguna de ellas presenta una fijación de nitrógeno eficiente (Wegener *et al.*, 2001). En alfalfa, ensayos de cinética de nodulación de las plantas mostraron que no alcanzan un número máximo de nódulos en las raíces, sino que se continúan formando, aunque principalmente en sus raíces secundarias, signo de su ineficiencia en la FBN (Del Papa *et al.*, 1999). Para el caso de la simbiosis eficiente entre *S. meliloti* y alfalfa, la presencia de un grupo sulfato en el extremo reductor de los FN es esencial para el establecimiento de la simbiosis (Schultze *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios previos demostraron que a pesar de que *R. favelukesii* LPU83 posee una sulfotransferasa de FN (*nodH*) funcional, esta no es esencial para la nodulación en alfalfa y es capaz de nodular esta especie aún con FN sin sulfatar (Torres Tejerizo *et al.*, 2011).

Como ha sido mencionado (ver sección I.3.2), otro determinante clave para la nodulación de *S. meliloti* son los exopolisacáridos (EPS), necesarios para el reconocimiento y señalización (Frayse *et al.*, 2003, Kawaharada *et al.*, 2015). *R. favelukesii* LPU83 sintetiza EPS I idéntico al producido por *S. meliloti* y, llamativamente, este no es esencial para la nodulación de alfalfa (Castellani *et al.*, 2021).

La diferenciación de los bacteroides dentro de los nódulos es esencial para una FBN eficiente en *Medicago* spp. Cambios en la forma y niveles de endorreduplicación del ADN son algunas de las características de este proceso. Dentro de los nódulos de alfalfa, se observó que hay una menor cantidad de bacteroides de *R. favelukesii* y que se encuentran entre uno y hasta seis bacteroides envueltos en una única membrana peribacteroidal, mientras que en los nódulos de *S. meliloti* los bacteroides se encuentran envueltos individualmente (Wegener *et al.*, 2001). En alfalfa, se aislaron más bacterias de los nódulos ineficientes de *R. favelukesii* que de aquellos infectados por *S. meliloti*, sugiriendo que los bacteroides no se encuentran totalmente diferenciados (Wegener *et al.*, 2001). La capacidad de *R. favelukesii* para nodular diferentes géneros, generando nódulos ocupados, aunque con bajos niveles de fijación de nitrógeno, es de gran interés para el estudio de los determinantes que diferencian a una FBN eficiente de una ineficiente.

I.5. Modelo de estudio y consideraciones generales

En el marco de una agricultura sustentable, la FBN por bacterias en asociación simbiótica con plantas leguminosas es un factor determinante desde el punto de vista de la conservación de los suelos y la productividad agropecuaria. La simbiosis de bacterias rizosféricas con *Medicago* spp. es relevante en la investigación agrícola debido a la capacidad de aumentar el rendimiento de los cultivos de alfalfa en suelos pobres en formas de nitrógeno asimilable de un modo ecológicamente amigable. Durante dicha simbiosis, la correcta expresión de numerosos determinantes es fundamental para la infección bacteriana, desarrollo del nódulo y diferenciación de las bacterias en bacteroides, forma crucial para una FBN exitosa. Como se mencionó previamente, numerosos genes han sido estudiados en las etapas tempranas de la formación de los nódulos, desde genes involucrados en la señalización y respuesta a FN hasta genes involucrados en la formación de los hilos de infección y desarrollo de los simbiosomas (Roy *et al.*, 2020). Sin embargo, poco se sabe sobre el proceso de diferenciación de las bacterias en bacteroides y los determinantes necesarios para que este proceso derive en una simbiosis fijadora de nitrógeno. Se han estudiado en mayor medida NCRs como determinantes de la planta para la diferenciación (Pan & Wang, 2017) y, en el caso de la bacteria, han sido caracterizados genes como *bacA* y *hrrP* (Poole *et al.*, 2018).

Usualmente, el estudio de estos determinantes se hace realizando mutaciones puntuales en genes bacterianos de interés y comparando el fenotipo obtenido con aquel de la cepa salvaje. La utilización de dos modelos de simbiosis, uno eficiente y otro ineficiente en la fijación de nitrógeno, permitiría evaluar de manera global y específica, genes involucrados en este proceso de diferenciación y los determinantes necesarios para una correcta FBN. En esta tesis, se plantea el uso del simbionte modelo *S. meliloti* 2011 en simbiosis con *M. truncatula* como modelo de simbiosis eficiente, y la cepa *R. favelukesii* LPU83 en simbiosis con dicha leguminosa como modelo de simbiosis ineficiente en la FBN.

Hipótesis de trabajo

La comparación entre nódulos eficientes e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno permite encontrar determinantes esenciales involucrados en la simbiosis. Estos determinantes son necesarios para una correcta diferenciación de los bacteroides y, por ende, el desarrollo de una simbiosis fijadora de nitrógeno eficiente.

Objetivo general

Caracterizar molecularmente nódulos eficientes e ineficientes en la fijación biológica del nitrógeno con el fin de desentrañar nuevos determinantes implicados en el proceso de diferenciación de las bacterias en bacteroides. Esta caracterización permitirá comprender mejor el proceso simbiótico en general y potenciar el desarrollo de mejoras en las bacterias utilizadas como inoculante.

Objetivos específicos

Teniendo en cuenta el objetivo general mencionado, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterización morfológica, histológica y funcionalmente los nódulos eficientes e ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno.
- 2- Comparación de los transcriptomas en nódulos de *Medicago truncatula*: determinación de genes diferencialmente expresados y categorías funcionales enriquecidas.
- 3- Estudio de fenotipos asociados a la diferenciación de los bacteroides y una correcta fijación biológica de nitrógeno.

Capítulo II: Materiales y métodos



II.1. Procedimientos microbiológicos

II.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

En la Tabla II.1 se encuentra el listado de cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, sus principales características y sus referencias.

Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo

Cepas	Características	Referencias
<i>Rhizobium favelukesii</i>		
LPU83	Nod ⁺ , Fix ^{+/-} en alfalfa. Sm ^R .	(Del Papa <i>et al.</i> , 1999)
LPU83 (pNod)	LPU83 portando el plásmido pNod, Sm ^R Sp ^R .	Este trabajo
LPU83 (pNif)	LPU83 portando el plásmido pNif, Sm ^R Tc ^R .	Este trabajo
LPU83 (pNod, pNif)	LPU83 portando los plásmidos pNod y pNif, Sm ^R Sp ^R Tc ^R .	Este trabajo
LPU83 pSym ⁻	LPU83 curada de su plásmido simbiótico pLPU83b. Sm ^R Nm ^R , Nod ⁻ Fix ⁻ en alfalfa.	(Nilsson <i>et al.</i> , 2020)
LPU83 pSym ⁻ (pNod)	LPU83 pSym ⁻ portando el plásmido pNod, Sm ^R Nm ^R Sp ^R .	Este trabajo
LPU83 pSym ⁻ (pNif)	LPU83 pSym ⁻ portando el plásmido pNod. Sm ^R Nm ^R Tc ^R .	Este trabajo
LPU83 pSym ⁻ (pNod, pNif)	LPU83 pSym ⁻ portando el plásmido pNod y pNif. Sm ^R Nm ^R Sp ^R Tc ^R .	Este trabajo
Δ0539::ΩGm	LPU83 con mutación por inserción de casete de resistencia a gentamicina en el gen LPU83_pLPU83b_0539. Sm ^R Gm ^R .	Este trabajo
Δ1075	LPU83 con mutación por delección del gen LPU83_1075. Sm ^R .	Este trabajo
Δ0539-1075	Derivada de Δ0539::ΩGm con mutación por delección del gen LPU83_1075, Sm ^R Gm ^R .	Este trabajo
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
2011	Sm ^R , Nod ⁺ Fix ⁺ en alfalfa.	J. Dénarié, France
Sma818R	<i>S. meliloti</i> 2011 curada de su plásmido simbiótico pSymA. Sm ^R Rf ^R , Nod ⁻ Fix ⁻ en alfalfa.	(Torres Tejerizo <i>et al.</i> , 2010)
Sma818R (pNod)	Sma818R portando el plásmido pNod, Sm ^R Rf ^R Sp ^R .	Este trabajo
Sma818R (pNif)	Sma818R portando el plásmido pNif. Sm ^R Rf ^R Tc ^R .	Este trabajo
Sma818R (pNod, pNif)	Sma818R portando los plásmidos pNod y pNif. Sm ^R Rf ^R Sp ^R Tc ^R .	Este trabajo
Sma818B	<i>S. meliloti</i> Sma818R (pLPU83b). Sm ^R Rf ^R , Nod ⁺ , Fix ^{+/-} en alfalfa.	(Torres Tejerizo <i>et al.</i> , 2010)
Rmp110	Sm ^R , Nod ⁺ Fix ⁺ en alfalfa.	(Geddes <i>et al.</i> , 2020)
C307	Sm ^R , Nod ⁺ Fix ⁺ en alfalfa.	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
C307 (pPG013)	C307 portando el plásmido pPG013, Sm ^R Nm ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
C307 (pPG014)	C307 portando el plásmido pPG014, Sm ^R Nm ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
C307 (pPG068)	C307 portando el plásmido pPG068, Sm ^R Nm ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
C307 (pPG013::0539-40)	C307 portando el plásmido pPG013::0539-40, Sm ^R Nm ^R .	Este trabajo
C307 (pPG013::0539)	C307 portando el plásmido pPG013::0539, Sm ^R Nm ^R .	Este trabajo
C307 (pPG013::1075)	C307 portando el plásmido pPG013::1075, Sm ^R Nm ^R .	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , F80 <i>dlac</i> ZDM15	Bathesda Res. Lab.

II.1.2. Medios de cultivo y crecimiento de microorganismos

II.1.2.A. Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* se llevaron a cabo en medio completo TY (Beringer, 1974) y medio mínimo VMM (*Vincent's modified medium*) (Vincent, 1970), dependiendo el experimento. Para los cultivos de *E. coli* se utilizó el medio LB (Sambrook *et al.*, 1989). Los componentes de cada uno de estos medios se describen en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Medios de cultivo utilizados.

TY	
CaCl ₂ .H ₂ O	0,7 g/L
Triptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
VMM	
MOPS	10 g/L
Manitol	10 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	37 mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	10 mg/L
H ₃ BO ₃	3 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,7 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,3 mg/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,12 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,065 mg/L
K ₂ HPO ₄	0,348 g/L
Biotina	1 mg/L
LB	
Glucosa	1 g/L
NaCl	5 g/L
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Para la preparación de medios de cultivo sólido se utilizó 15 g/L de agar. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 120°C durante 20 minutos. La temperatura de incubación para el crecimiento de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* fue 28°C, para el caso de *E. coli*, se incubó a 37°C. En el caso de cultivos líquidos, en todos los casos, se utilizó 180 rpm de agitación.

II.1.2.B. Medios de conservación

Las cepas se conservaron a largo plazo por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía, a los cuales se suplementó con glicerol estéril

hasta llegar a la concentración de 20% v/v o 50% v/v, para ser preservadas a -80°C o -20°C, respectivamente.

II.1.2.C. Antibióticos utilizados

Los antibióticos fueron adicionados al medio de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos cuando se requirieron. Los mismos fueron preparados en agua desionizada salvo para la tetraciclina, donde se utilizó etanol y, rifampicina, en el que se utilizó metanol para su preparación. Las soluciones de antibiótico preparadas en agua se esterilizaron mediante filtración utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones finales para cada antibiótico en el medio de cultivo fueron (µg/ml): para *E. coli* kanamicina sulfato (Km) 50, cloranfenicol (Cm) 20, tetraciclina (Tc) 10 y gentamicina (Gm) 10; y para rizobios, estreptomycin (Sm) 400, neomicina sulfato (Nm) 120, rifampicina (Rf) 200, espectinomicina (Sp) 200, tetraciclina (Tc) 5 para *Sinorhizobium* y 2,5 para *Rhizobium* y, gentamicina (Gm) 30.

II.1.3. Recuento de bacterias viables

El recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio líquido (proveniente de muestras de nódulo o cultivo) se determinó utilizando el método de recuento en gotas de placa (Herigstad Becky, 2001). Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de la suspensión de bacterias utilizando NaCl 0,9% o solución de Rolfe, y se colocaron 10 gotas de 10 µl en medio TY sólido con o sin antibiótico, dependiendo del ensayo realizado. Se incubó durante 48 o 72 hs a 28°C y pasado este tiempo se contaron las colonias presentes en cada gota. En aquellas diluciones donde se podían contar entre 1 y 20 colonias, se realizó un promedio de los recuentos para las 10 gotas y se refirió al número de UFC por ml de cultivo original o mg de nódulo fresco, dependiendo de la muestra inicial.

II.1.4. Transformación de células electrocompetentes

Para la preparación de células de *E. coli* electrocompetentes se utilizó la técnica de Tung y Chow (1995) con modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB líquido sin cloruro de sodio con 1 ml de un cultivo saturado de la cepa de *E. coli* de interés. Se incubó el cultivo a 37°C con agitación de 180 rpm hasta llegar a un valor de DO_{600nm} de 0,6. Se centrifugó el cultivo a 4000 g por 15 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con glicerol 10% frío. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en glicerol 10% con agua bidestilada y se fraccionó en alícuotas de 100 µl.

Para llevar a cabo la electroporación de los plásmidos, se utilizó el equipo Gene Pulser con cubetas de 0,2 cm bajo las condiciones recomendadas por el fabricante, 25

μF , 200Ω , 2,5 kV. Luego de la transformación, se adicionó 1 ml de medio LB líquido a las células y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir la expresión de los genes presentes en el plásmido. Finalmente, las bacterias fueron plaqueadas en medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado.

II.1.5. Conjugaciones triparentales

Se utilizó esta técnica para transferir plásmidos no autotransmisibles desde cepas que no poseían las funciones compatibles para la transferencia de plásmidos. Se empleó la técnica de Simon *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Se mezclaron en proporción de volúmenes 1:1:1 la cepa donadora (*E. coli* DH5 α con el plásmido de interés), la cepa receptora (*Sinorhizobium* o *Rhizobium*) y la cepa movilizadora (*helper*). Esta última siendo una cepa de *E. coli* portando el plásmido *helper* pRK600 (Ver Tabla II.3). Los cultivos en fase exponencial tardía se mezclaron en un microtubo eppendorf de 1,5 ml (500 μl de cada cultivo). Esta mezcla fue centrifugada a 600 g durante 10 minutos, y luego resuspendida en 100 μl de medio líquido TY. La mezcla fue colocada sobre una placa conteniendo TY sólido sin antibiótico. Se incubaron a 28°C de 12 a 16 horas. Posterior a este tiempo, la mezcla de bacterias fue resuspendida en TY líquido y plaqueada en medio sólido TY suplementada con los antibióticos correspondientes. Se realizaron controles en los que la cepa donadora, receptora y movilizadora se procesaron de manera independiente.

II.1.6. Mutantes por doble recombinación homóloga

Se llevó a cabo una estrategia de manera tal de obtener dos fragmentos de los extremos del gen a mutar en el vector pK18*mobsacB*. Se transfirió por conjugación triparental el plásmido a la cepa de LPU83 y se seleccionó aquellas colonias resistentes a neomicina. Se chequeó la integración del plásmido mediante PCR utilizando combinaciones de cebadores M13-Fw o M13-Rv con cebadores que hibriden en las zonas externas al gen de interés. Una vez corroborado el primer evento de recombinación, se procedió a cultivar este mutante simple en medio TY. Alícuotas de este cultivo fueron plaqueadas en medio sólido TY suplementado con sacarosa 10%. Los clones capaces de crecer en sacarosa fueron testeados en su sensibilidad a neomicina y analizados por PCR buscando aquellos con la delección en el gen.

II.2. Técnicas de biología molecular

II.2.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos que fueron utilizados en este trabajo y sus características principales se muestran en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Propiedades	Referencias
pBSL142	Vector de clonado. Casete de resistencia a Gm. Gm ^R .	(Alexeyev <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-2	Vector de clonado. Genes bajo promotor Lac. Replicativo en rizobios. Km ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS2::0539	Derivado de pBBR1MCS-2 con gen LPU83_pLPU83b_0539 clonado en el sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pBBR1MCS2::0539-Rel	Derivado de pBBR1MCS2::0539 digerido <i>BamHI</i> y religado. Km ^R	Este trabajo
pBBR1MCS2::0539-40	Derivado de pBBR1MCS-2 con genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 clonados en sitios <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i> . Km ^R	Este trabajo
pBBR1MCS2::1075	Derivado de pBBR1MCS-2 con gen LPU83_1075 clonado en el sitio <i>SmaI</i> . Km ^R	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector de clonado de alto número de copias. Confiere sensibilidad a sacarosa, Km ^R .	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobsacB</i> ::0539-40	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> con genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 clonados en el sitio <i>SmaI</i> , Km ^R .	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i> ::1075	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> con genes LPU83_1075 clonado en el sitio <i>SmaI</i> , Km ^R .	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i> ::0539ΩGm	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> ::0539-40 con gen LPU83_pLPU83b_0539 interrumpido por un casete de resistencia a Gm. Gm ^R . Utilizado para generar el mutante.	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i> ::Δ1075	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> ::1075 con extremo 5' y 3' del gen LPU83_1075, Km ^R . Utilizado para generar el mutante.	Este trabajo
pRK600	Cm ^R , replicón ColE1, <i>tra</i> ⁺ de RK2	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pNod	Vector replicativo en rizobios portando los genes <i>nod</i> necesarios para simbiosis. Sp ^R	Provisto por Dr. Barney Geddes
pNif	Vector replicativo en rizobios portando los genes <i>nif</i> y <i>fix</i> necesarios para simbiosis. Tc ^R	Provisto por Dr. Barney Geddes
pPG013	Vector replicativo en rizobios con promotor del gen <i>hrrP</i> río arriba del sitio de clonado múltiple, Km ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
pPG014	Derivado del pPG013, con secuencia codificante del gen <i>hrrP</i> río abajo del promotor <i>hrrP</i> , Km ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
pPG068	Derivado del pPG013, con secuencia codificante del gen <i>sapA</i> río abajo del promotor <i>hrrP</i> , Km ^R .	(Benedict <i>et al.</i> , 2021)
pPG013::0539-40	Derivado del pPG013 con región codificante de los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 río abajo del promotor de <i>hrrP</i> , Km ^R .	Este trabajo

Plásmidos	Propiedades	Referencias
pPG013::0539	Derivado del pPG013 con región codificante del gen LPU83_pLPU83b_0540 río abajo del promotor de <i>hrrP</i> , Km ^R .	Este trabajo
pPG013::1075	Derivado del pPG013 con región codificante del gen LPU83_1075 río abajo del promotor de <i>hrrP</i> , Km ^R .	Este trabajo

II.2.2. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala (“miniprep”)

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron obtenidos siguiendo la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Luego de la lisis alcalina, los plásmidos fueron purificados mediante un protocolo de unión a sílica (Sigma). Esta fue preparada colocando 2 g de sílica en 15 ml de agua destilada, se centrifugó a 2000 g por 2 minutos y se realizaron 3 lavados con agua destilada. Finalmente, la sílica fue resuspendida en dos volúmenes de agua miliQ. Se adicionaron 10 µl de dicha suspensión de sílica al extracto de la lisis alcalina, se mezcló por vórtex y se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 500 µl de solución de lavado (50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5; 2.5 mM EDTA y 50 % etanol). Se dejó secar la sílica a 37°C y para finalizar, se agregaron 30 µl de agua destilada y se incubó 5 minutos a 60°C. Se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad y se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico.

II.2.3. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando un termociclador Biometra TRIO (Analytik-jena, Alemania) o similares. Se utilizaron las siguientes ADN polimerasas: Phusion (Thermo Fischer) y Taq (Promega o PB-L), ambas a sus temperaturas óptimas de elongación, 68°C y 72°C, respectivamente. Las mezclas de reacción estaban compuestas por: buffers provistos por el fabricante, 200 µM dNTPs, cebadores a 0,5 µM cada uno, 1 U de ADN polimerasa y molde. Para reacciones de amplificación de fragmentos de clonado se utilizó ADN polimerasa Phusion utilizando ADN total de molde con un volumen final de 20 µl. Para el caso de PCRs de chequeo se utilizó Taq ADN polimerasa, utilizando como molde células provenientes de cultivos líquidos o sólidos, resuspendidas en agua destilada, hervidas durante 10 minutos y centrifugadas a 14000 g durante 10 minutos.

Los cebadores utilizados se encuentran en la tabla II.4 junto con su correspondiente secuencia. Finalizada la reacción de PCR, 5 µl de producto fueron sembrados en un gel de agarosa y posteriormente teñidos en bromuro de etidio para su revelado.

Tabla II.4. Cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción	Referencias
M13-Fw	CAGGAAACAGCTATGAC	Chequeo de construcciones	Universales
M13-Rv	GTTTCCCAGTCACGAC	Chequeo de construcciones	Universales
NodC-Fw	AAAAGGTACCGCGATTGTTGATGCAGT	Chequeo plásmido pNod	Este trabajo
NodC-Rv	AAAAAGATCTTCCGAGAACCATCATCA ACGACATAG	Chequeo plásmido pNod	Este trabajo
NifD-LPU83-Fw	GCCGGTGCCTGATAG	Chequeo plásmido pNif	Este trabajo
NifD-LPU83-Rv	CGCGATTGGGTCTTCG	Chequeo plásmido pNif	Este trabajo
NifD-Sme2011-Fw	AAAGGATCCGCGCGTGCCATTC	Chequeo plásmido pNif	Este trabajo
NifD-Sme2011-Rv	AAACTGCAGGGATTGCGGCATGTGG	Chequeo plásmido pNif	Este trabajo
0539-Fw-in	CAACTCAGCGTGTAGTG	Amplifica genes LPU83_pLPU83_0539 y LPU83_pLPU83_0540	Este trabajo
0540-Rv-in	CCATACCATCCAACCTG	Amplifica genes LPU83_pLPU83_0539 y LPU83_pLPU83_0540	Este trabajo
0539-Fw-out	GACGGATGTATGTGAGTG	Chequeo mutante LPU83_pLPU83_0539	Este trabajo
0540-Rv-out	GATCGGCAGAGAGAAG	Chequeo mutante LPU83_pLPU83_0539	Este trabajo
p83b-0539-Fw	GACGGATGTATGTGAGTG	Amplifica genes LPU83_pLPU83_0539 y LPU83_pLPU83_0540	Este trabajo
p83b-0540-Rv	GATCGGCAGAGAGAAG	Amplifica gen LPU83_pLPU83b_0539 y parte de LPU83_pLPU83b_0540	Este trabajo
p83b-0540-Right	TGCCATTTCTGTCCCTCGA	Amplifica genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540	Este trabajo
1075-Fw-in	CTTGCTGATCTGATGC	Amplifica gen LPU83_1075	Este trabajo
1075-Rv-in	CTCGAGCTCTACTGAATC	Amplifica gen LPU83_1075	Este trabajo
1075-Fw-sma	AAAAACCCGGGGTCTGTCGTCTCATTG C	Amplifica vector con delección en gen LPU83_1075	Este trabajo
1075-Rv-sma	AAAAACCCGGGGTTGGAAGGTATCAC G	Amplifica vector con delección en gen LPU83_1075	Este trabajo
1075-Fw-out	CTGTTCGAAGCCTATG	Chequeo mutante LPU83_1075	Este trabajo
1075-Rv-out	TAGCCGATCATAACAGC	Chequeo mutante LPU83_1075	Este trabajo
Hrrp-int-fw	ACGGCATAACTACGAC	Chequeo de clonados en pPG013	Este trabajo
Hrrp-ext-rv	AGGTGAGATGACAGGAG	Chequeo de clonados en pPG013	Este trabajo

II.2.4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-2% dependiendo el tamaño de fragmento) utilizando buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0) como buffer de corrida. Como solución de siembra se utilizó de azul de bromofenol 0,25% y sacarosa 40%. El voltaje de trabajo varió de 80 a 100 V según la electroforesis. Para su revelado, se procedió a

teñir el gel en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 10 minutos. Luego de lavar el gel con agua destilada, se visualizaron los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta. Se registraron los resultados utilizando una cámara digital bajo iluminación ultravioleta. El tamaño de los fragmentos fue determinado por interpolación gráfica, representando el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido en función de la distancia recorrida en el gel. Como marcadores de peso molecular se utilizó ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* para fragmentos de gran tamaño, o marcadores de peso molecular comerciales como Ladder 100 (PB-L) para fragmentos de menos de 1000 pb.

II.2.5. Geles de lisis *in situ*

Los perfiles plasmídicos de las cepas construidas fueron obtenidos mediante el método de lisis *in situ* de Eckhardt (Eckhardt, 1978) con modificaciones. Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido TY durante 24 hs. Se utilizaron alícuotas de 1 ml de cultivo correspondientes a una DO_{600nm} de 0,2. Las mismas fueron centrifugadas durante 3 minutos y lavadas con 1 ml de una solución de sarcosilato de sodio 0,3% p/v. Las células se centrifugaron y el pellet bacteriano fue resuspendido en ficoll 20% p/v y mantenidas en frío hasta el momento de sembrar en el gel de agarosa. Este fue preparado en una concentración de 0,8% p/v, utilizando buffer TBE como buffer de corrida (Tris 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 0,002 M). Previo a la siembra de las muestras, en cada fosa de gel se introdujeron 25 µl de una solución de SDS 10% p/v con xylene cianol, y la electroforesis se llevó a cabo a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. Se detuvo la corrida y se procedió a la siembra, para ello se agregaron 10 µl de solución de lisis (sacarosa 8% p/v, ficoll 2% p/v, Tris 50mM EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1 mg/ml) a cada tubo de muestra previo a la siembra, se mezcló de forma suave e inmediatamente se sembraron 15 µl por calle. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 30V y luego durante 90 -120 minutos a 100 V. Finalizada la electroforesis, se lavó el gel con agua destilada y se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio y revelarlo bajo luz ultravioleta.

II.2.6. Purificación de fragmentos de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN luego de cortar fragmentos de gel de agarosa, se lo colocó en un microtubo y se le agregaron 5 volúmenes de NaI 6M. Se incubó a 55°C durante 10 minutos, mezclando por inversión cada 2 minutos. Luego de fundida la agarosa, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a purificar el ADN mediante sílica (procediendo como la purificación de ADN plasmídico, ver sección II.2.2).

II.2.7. Tratamientos enzimáticos del ADN

Los tratamientos del ADN con enzimas, ya sea enzimas de restricción o ligación, se llevaron a cabo en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y buffer indicadas por el comerciante. En caso de ser necesario, las enzimas fueron inactivadas por desnaturalización térmica.

II.2.8. Construcción de cepas complementadas en genes simbióticos

Los plásmidos pNod y pNif utilizados en el capítulo VI fueron provistos por el Dr. Barney Geddes (NDSU, *North Dakota State University*), los mismos son replicativos en rizobios y portan genes *nod* (pNod) y genes *nif* y *fix* (pNif) de *S. meliloti* Rmp110. Estos plásmidos se transfirieron desde cepas de *E. coli* DH5 α mediante conjugaciones triparentales a las cepas receptoras: *S. meliloti* Sma818R, *R. favelukesii* LPU83 y *R. favelukesii* LPU83 pSym⁻. La transferencia de estos plásmidos se chequeó mediante PCR utilizando los cebadores NodC-Fw y NodC-Rv para amplificar 487 pb del plásmido pNod, y los cebadores NifD-Sme2011-Fw y NifD-Sme2011-Rv para amplificar 1674 pb del plásmido pNif y cebadores que amplifican un fragmento del gen *nifD* de LPU83 (NifD-LPU83-Fw y NifD-LPU83-Rv) con un tamaño de 561 pb, distinto al generado con la otra combinación de cebadores utilizada para los chequeos. Para las bacterias portadoras de ambos plásmidos, una vez transferido uno de ellos se procedió a hacer una segunda conjugación triparental para transferir el plásmido restante.

II.2.9. Construcción de cepas mutantes de LPU83

II.2.9.A. Mutante en LPU83_pLPU83b_0539 (Δ 0539:: Ω Gm)

Para la construcción del mutante LPU83 Δ 0539:: Ω Gm, en primer lugar se amplificó un fragmento de 2963 pb con ADN polimerasa correspondiente a ambos genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 con los cebadores 0539-Fw-in y 0540-Rv-in utilizando como molde una extracción de ADN total de LPU83. Luego, se clonó en el sitio *Sma*I del vector pK18*mobsacB*. Debido a que la inactivación de la enzima de restricción no fue total, se perdió un fragmento del extremo 3' del amplicón inicial al tener este un sitio *Sma*I. Del fragmento inicial de 2963 pb, se clonó un fragmento de 2590 pb en el vector. Se chequeó esta inserción mediante PCR utilizando los cebadores universales M13-Fw y M13-Rv. De esta manera se obtuvo el vector pK18*mobsacB*::0539-40. El mismo se digirió en el sitio *Xho*I, liberando 654 pb del centro del gen LPU83_pLPU83b_0539. En ese sitio se subclonó el casete de resistencia a gentamicina proveniente del vector pBSL142 digerido *Sa*II. La construcción pK18*mobsacB*::0539 Ω Gm se secuenció y se transfirió por conjugación a LPU83. Se

chequeó la integración del plásmido y, posteriormente, el segundo evento de recombinación homóloga por presión con sacarosa. La mutación de este gen fue chequeada mediante PCR con los cebadores 0539-Fw-out y 0540-Rv-out. De esta manera, se interrumpió el gen LPU83_pLPU83b_0539 utilizando un casete de resistencia a gentamicina.

II.2.9.B. Mutante en LPU83_1075 (Δ 1075)

Para el mutante LPU83 Δ 1075, en primer lugar, se amplificó mediante PCR con ADN polimerasa Phusion el gen LPU83_1075 utilizando los cebadores 1075-Fw-in y 1075-Rv-in. El fragmento de 1507 pb fue clonado en el sitio *Sma*I del vector pK18*mobsacB*. Se chequeo esta inserción mediante PCR utilizando los cebadores universales M13-Fw y M13-Rv. Una vez listo este clonado (pK18*mobsacB*::1075), se utilizaron los cebadores 1075-Fw-Sma y 1075-Rv-Sma los cuales amplifican el vector con el gen LPU83_1075 desde los extremos 5' y 3' del gen, eliminando 1008 pb del mismo y agregando sitios de reconocimiento de la enzima *Sma*I en sus extremos. Finalizada la PCR, se digirió con *Sma*I y se ligó el fragmento. Se chequearon las construcciones mediante PCR con los cebadores M13-Fw y M13-Rv y se secuenció el clon positivo. El plásmido pK18*mobsacB*:: Δ 1075 se transfirió por conjugación a la cepa LPU83 y se chequeó la inserción del vector en el sitio correcto para luego buscar el segundo evento de recombinación por presión de selección con sacarosa. Se evaluó la mutación del mismo mediante PCR utilizando los cebadores 1075-Fw-out y 1075-Rv-out. Así, se obtuvo un mutante por delección de un fragmento interno del gen LPU83_1075.

II.2.9.C. Mutante LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_1075 (Δ 0539-1075)

Finalmente, el doble mutante LPU83 Δ 0539-1075 se construyó partiendo del mutante LPU83 Δ 0539:: Ω Gm y se realizó la mutación por doble recombinación homóloga en el gen LPU83_1075 utilizando el plásmido pK18*mobsacB*:: Δ 1075 como se describió en el caso del mutante LPU83 Δ 1075.

II.2.10. Construcción de plásmidos para expresar las peptidasas dentro del nódulo

II.2.10.A. Construcción del plásmido pPG013::0539-40

Para la construcción del plásmido pPG013::0539-40 se amplificó un fragmento de 3287 pb utilizando la polimerasa Phusion con los cebadores p83b-0540-Fw y p83b-0540-Right, amplificando los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540. Este fragmento se clonó en el pBBR1MCS-2 luego de digerirlo con la enzima *Sma*I. La

construcción pBBR1MCS2::0539-40 fue digerida con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* liberando un fragmento de 3317 pb. Este fue clonado de manera dirigida en el pPG013 (Benedict *et al.*, 2021) utilizando las mismas enzimas de restricción, generando la construcción pPG013::0539-40 con los genes río abajo del promotor del gen *hrrP*.

II.2.10.B. Construcción del plásmido pPG013::0539

Se amplificó un fragmento de 3131 pb con los cebadores p83b-0540-Fw y p83b-0540-Rv y utilizando la polimerasa Phusion, amplificando el gen LPU83_pLPU83b_0539 y parte del gen LPU83_pLPU83b_05340. Fue clonado en el pBBR1MCS-2 digerido con la enzima *SmaI*, buscando aquel clon donde el fragmento haya ligado en la orientación correcta, bajo el promotor Lac del plásmido. El plásmido resultante, pBBR1MCS2::0539 se digirió con la enzima de restricción *BamHI*, de manera de escindir la parte del gen LPU83_pLPU83b_05340 que se había clonado. Se purificó la banda con tamaño 7106 pb y se religó el plásmido, obteniendo el vector pBBR1MCS2::0539-Rel. Este fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y se clonó el fragmento de 1992 pb correspondiente al gen LPU83_pLPU83b_0539 en pPG013 digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta manera se obtuvo el plásmido pPG013::0539, con el gen río abajo del promotor del gen *hrrP*.

II.2.10.C. Construcción del plásmido pPG013::1075

En primer lugar, se amplificó el gen LPU83_1075 utilizando la polimerasa Phusion con los cebadores 1075-Fw-in y 1075-Rv-in. El fragmento de 1507 pb fue clonado en el pBBR1MCS-2 digerido *SmaI*. Se buscó aquel clon que quedara orientado río abajo del promotor Lac. La construcción pBBR1MCS2::1075 fue digerida con las enzimas *HindIII* (extremo N-terminal) y *BamHI* (extremo C-terminal) y el fragmento de 1537 pb obtenido se clonó en el plásmido pPG013 digerido con las mismas *HindIII* y *BglII*, obteniéndose la construcción pPG013::1075, con el gen LPU83_1075 bajo el promotor del gen *hrrP*.

Las tres construcciones se chequearon mediante PCR utilizando los cebadores Hrrp-int-Fw y Hrrp-ext-Rv buscando el tamaño correspondiente. Los plásmidos fueron evaluados por secuenciación. Las tres construcciones fueron transferidas por conjugación triparental a la cepa de *S. meliloti* C307, utilizada en los ensayos de sobreexpresión de las peptidasas presentes en *S. meliloti* (Benedict *et al.*, 2021).

II.3. Ensayos en planta

II.3.1. Esterilización y germinación de semillas

Para los ensayos en planta se utilizaron semillas de *M. truncatula* A17, *M. truncatula* A20 y *M. sativa* Sardi 10. Las semillas de *M. truncatula* se esterilizaron superficialmente de la siguiente manera: se sumergieron las semillas durante 5 minutos en ácido sulfúrico concentrado agitando suavemente durante este tiempo, se descartó el ácido y luego se realizaron 7 lavados con agua destilada estéril fría. Por último, las semillas se incubaron con una solución de hipoclorito de sodio 12 g/L durante 10 minutos para posteriormente realizar 7 lavados con agua destilada estéril. Para las semillas de *M. sativa*, se realizó una esterilización superficial con etanol e hipoclorito de sodio. Se incubaron las semillas con etanol 70% durante 10 minutos, luego se descartó el etanol y se las incubó con hipoclorito de sodio 12 g/L durante 10 minutos. Finalmente, se realizaron 7 lavados con agua destilada estéril. En ambos casos, se colocaron semillas en placas de LB y TY como control de la esterilización superficial de las mismas.

Las semillas se colocaron en placas de agar-agua 0,8% p/v en condiciones de esterilidad y se las dejó reposar durante una noche a 4°C para su sincronización. Finalmente, se las colocó en la cámara de plantas a 22°C durante 12-16 horas para su germinación.

II.3.2. Condiciones de crecimiento

Luego de que las raíces de las plántulas tengan aproximadamente 1 cm, se introdujeron en dos tipos de soporte dependiendo el experimento: en macetas con vermiculita o en placas de Petri estériles con agar con medio libre de nitrógeno Rolfe (Tabla II.5) (Barsch *et al.*, 2006). Las soluciones para el medio libre de nitrógeno se prepararon por separado (1000 o 2000 veces más concentradas según corresponda) y se esterilizaron por autoclave, menos la solución D que se esterilizó por filtro de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro. Para el riego de macetas se completó agua estéril con cada una de las soluciones y, para los experimentos en agar, se preparó agar agua 1% p/v y se completó una vez esterilizado el mismo.

Las macetas se limpiaron con etanol 70% y una vez secas se rellenaron con vermiculita estéril, la cual se humedeció con medio Rolfe. Las plantas se regaron una o dos veces por semana dependiendo la necesidad con agua o solución Rolfe. Para el caso de los ensayos en placa, las plántulas se transfirieron a las placas con agar en condiciones de esterilidad y se les cubrió la mitad inferior con nylon oscuro para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces.

Todos los ensayos se realizaron en cámara de cultivo de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 22°C de día y 16°C de noche.

Tabla II.5. Composición del medio Rolfe.

Solución A (2000x)	
CaCl ₂ •2H ₂ O	294 g/L
Solución B+B₁ (2000x)	
K ₂ HPO ₄	150 g/L
KH ₂ PO ₄	50 g/L
Solución B₁ (1000x)	
K ₂ HPO ₄	116 g/L
Solución C (2000x)	
Fe-Citrato	6,7 g/L
Solución D (2000x)	
MgSO ₄ •7H ₂ O	123 g/L
K ₂ SO ₄	87 g/L
MnSO ₄ •H ₂ O	0,338 g/L
H ₃ BO ₃	0,247 g/L
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,288 g/L
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,1 g/L
CoSO ₄ •7H ₂ O	0,056 g/L
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,048 g/L

II.3.3. Inoculación de las raíces

Luego de dos días en la cámara de plantas, se inocularon las raíces de las plantas con los rizobios correspondientes al ensayo. Los inóculos se prepararon con un cultivo bacteriano saturado y medio Rolfe, de manera que la concentración bacteriana era de aproximadamente 10⁷ UFC/ml. Se inoculó cada raíz con 100 µl de este preparado. Se realizaron recuentos de bacterias en placa de los inóculos realizando diluciones seriadas 1/10 de los mismos para colocar gotas de 10 µl en medio TY sin antibiótico.

II.3.4. Procesamiento de las plantas

Una vez finalizados los ensayos, según el tiempo que se indique en cada uno de ellos, las plantas fueron procesadas.

II.3.4.A. Recuento de viables bacterias viables de nódulo

Para determinar la cantidad de bacterias viables dentro de los nódulos, se cosecharon aproximadamente 10 mg húmedos de nódulos (entre 20 y 30 nódulos dependiendo el tipo) y se los colocó en un microtubo previamente pesado. Se determinó el peso del tubo con nódulos y se procedió a la esterilización superficial de los mismo. Para esto, se los trató con una solución de peróxido de hidrogeno 30 volúmenes durante 10 minutos. Se realizaron 7 lavados con agua destilada y finalmente se los resuspendió en 250 µl de NaCl 0,9%. De este volumen, 50 µl se colocaron en una placa de TY como control de la esterilización de los nódulos. Finalmente, los nódulos se molieron utilizando un micropistilo estéril en los 200 µl de NaCl 0,9% restantes. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de este extracto inicial y se realizaron recuentos en gota en placas de TY con los antibióticos correspondientes. Una vez incubadas las placas a 28°C durante 48-72 horas, se determinó el promedio de UFC para cada dilución plaqueada y se refirió este número de UFC al peso de nódulos inicial.

II.3.4.B. Procesamiento general de las plantas

Para determinar el número de nódulos por planta se contó individualmente la cantidad de nódulos totales de cada planta de cada maceta. Se realizó un promedio del número de nódulos/planta por tratamiento y se analizó por diferencias estadísticas.

Para determinar el peso seco de la parte aérea de la planta, se cortaron y se colocaron en un sobre cada planta de forma individual y se la incubó a 60°C hasta obtener un peso constante (un mínimo de 7 días). Luego, cada planta fue pesada en una balanza analítica. Se realizó un promedio del peso/planta por tratamiento y se analizó por diferencias estadísticas.

II.4. Microscopía de nódulos

II.4.1. Microscopio óptico

Para la observación microscópica de los nódulos, los nódulos se embebieron en Technovit® 7100. Para ello, los nódulos fueron incubados en buffer cacodilato de sodio 0,05 M durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se retiró el buffer y se incubó nuevamente 30 minutos con buffer nuevo. A continuación, se agregó 1 ml de solución fijadora (1 ml de glutaraldehído, 1 ml de cacodilato de sodio 0,5 M y 8 ml de H₂O) y se incubó aplicando vacío durante 1 hora. Se retiró la solución fijadora y se incubó nuevamente con solución fijadora nueva toda la noche con agitación.

Luego, se comenzó con una serie pasos de deshidratación con etanol 10%, 30%, 50% cada uno durante 1 hora a temperatura ambiente y una a 70% toda la noche con

agitación a 4°. Al otro día, se continuo con una deshidratación en etanol 90% y tres pasos con etanol 100%, cada uno durante 1 hora a 4°. A continuación, se comenzó la incrustación (*embedding*). Para ello, se agregó 1 ml de una solución de Etanol:Technovit 7100 3:1 y se incubaron los nódulos con agitación durante 1 hora a 4°. Se retiró el líquido y se agregó 1 ml de una solución de Etanol:Technovit 7100 1:1 y se incubaron los nódulos con agitación 1 hora a 4°. Se retiró el líquido y se agregó 1 ml de una solución de Etanol: Technovit 7100 1:3 y se incubaron los nódulos con agitación 1 hora a 4° C. Por último, se realizaron 2 incubaciones sucesivas con Resina Technovit 7100 con agitación durante 1 hora a 4° C; finalmente se incubó con Resina Technovit 7100 con agitación durante toda la noche a 4° C. Se retiró el líquido y se colocaron los nódulos en moldes para la inclusión. Cada molde fue rellenado con una solución que contenía 1 ml de Resina Technovit 7100 cada 66 microlitros de solución Hardener II y se dejó polimerizar toda la noche. Posteriormente, se colocó un Histoblock y se preparó una solución en un tubo de 2 ml, añadiendo polvo Technovit 3040 (hasta la marca de 1 ml del tubo) y 500 µl de solución Technovit 3040. Esta solución se utilizó para pegar el molde con los nódulos al Histoblock y se dejó pegar toda la noche. Una vez secos, se retiraron los Histoblock con el molde conteniendo los nódulos incrustados.

Los nódulos fueron cortados con micrótomo en secciones de entre 5 y 7 µm de espesor, y colocados inmediatamente en agua tibia (40 ° C -50 ° C), donde los cortes se extienden totalmente. Las secciones fueron colocadas sobre portaobjetos y se secaron a temperatura ambiente. Se realizó una tinción utilizando azul de toluidina 0,05 % p/v luego de aproximadamente 2 minutos se realizaron lavados con agua destilada estéril. Las secciones se secaron a temperatura ambiente y se cubrieron con cubreobjetos para ser observadas al microscopio óptico. Finalmente, los cortes elegidos se escanearon en un scanner de alta resolución Mirax Desk (Zeiss).

II.4.2. Microscopía confocal

Para observar los nódulos en el microscopio confocal, se procedió en primer lugar a cortarlos en un vibrótomo (Leica VT1000 S). Para ello, los nódulos fueron embebidos en agarosa *low melting* 6% y cortados en secciones de entre 50-70 µm de espesor. Estos cortes se colocaron en buffer PBS (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na₂HPO₄ 0,01 M y KH₂PO₄ 0,0018 M, pH 7,4) hasta el momento de su procesamiento. Se realizó una tinción con yoduro de propidio y Syto9 utilizando el kit comercial LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fischer). Para esto, un microtubo con 100 µl de buffer PBS y las secciones de nódulos se incubaron con 20 µl de Syto9 12 µM durante 5 minutos en oscuridad, pasado este tiempo se adicionaron 20 µl de yoduro de propidio 60 µM y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, se removió la solución y se resuspendieron las

secciones en 100 µl de PBS. Los cortes se colocaron entre dos cubreobjetos y se los observó al microscopio confocal espectral Leica TCS SP5.

II.4.3. Microscopía electrónica

Para las observaciones en microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés *Scanning electron microscope*) se trabajó en colaboración con el grupo de la Dra. Eva Kondorosi del Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences (Szeged, Hungría). En todos los casos se observaron con un SEM JEOL JSM-7100F/LV.

Para el estudio de la morfología de bacterias y bacteroides, en primer lugar, se procedió como en la sección II.3.4.A, se cosecharon aproximadamente 10 mg húmedos de nódulos y se procedió a la esterilización superficial de los mismo. Los nódulos se molieron utilizando un micropistilo estéril en 200 µl de NaCl 0,9% y se filtraron con un filtro Celltrics de 10 µm. Una gota de 10 µl fue colocada sobre un disco plástico pegado con cinta de carbono doble faz en un pocillo de placa *multiwell* de 24 pocillos. Una vez secado el líquido se fijaron con 2,5% glutaraldehído en buffer cacodilato de sodio 0,05 M durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron deshidratadas con etanol (de 30% a 100%) como se describió anteriormente en II.4.1. A continuación, las muestras fueron secadas mediante la técnica de punto crítico y se recubrieron con una capa de 10 nm de oro.

Para observar secciones de nódulos de *M. truncatula* y *M. sativa* infectados por LPU83, Sme2011 y Sma818B fueron embebidos en 6% agarosa *low melting*, se cortaron secciones de 50-70 µm de espesor usando un vibrótomo Leica VT1200S. Las secciones se fijaron con 2,5% glutaraldehído en buffer cacodilato de sodio 0,05 M durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron deshidratadas con etanol (de 30% a 100%) como se describió anteriormente en la sección II.4.1. A continuación, las muestras fueron secadas mediante la técnica de punto crítico y se recubrieron con una capa de 10 nm de oro.

II.5. Transcriptómica dual

II.5.1. Condiciones y obtención de las muestras

Para los experimentos de transcriptómica dual se obtuvieron dos tipos de muestras: muestras correspondientes a nódulos de *M. truncatula* A17 infectada con LPU83, Sme2011 o Sma818B y muestras de las bacterias en vida libre.

Para las muestras correspondientes a nódulos, tres experimentos independientes se llevaron a cabo para recolectar las muestras. Se realizaron ensayos en plantas en placas de Petri con medio Rolfe agarizado utilizando *M. truncatula* A17. Las semillas se

esterilizaron y germinaron como se detalló en la sección II.3. Se inocularon plantas con tres cepas bacterianas distintas: *R. favelukesii* LPU83, *S. meliloti* 2011 y *S. meliloti* Sma818B. Se utilizaron dos tiempos de cosecha para los nódulos generados: 10 y 31 dpi. Los nódulos de entre 45 y 60 plantas, equivalente a 0,3 – 0,6 g húmedos, se cortaron con bisturí (sin tomar la raíz) y se congelaron rápidamente en un tubo falcon de 50 ml lleno de nitrógeno líquido. Una vez completada la colecta de nódulos, el nitrógeno líquido se dejó evaporar e inmediatamente las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Para la extracción del ARN total se utilizó el kit comercial *mirVana* (Life Technologies). Los nódulos se molieron sobre hielo seco y se resuspendió el polvo obtenido en *Lysis/Binding buffer*. El homogenato se colocó en tubos con bolitas de vidrio para su ruptura en *rybolizer 2 x 30"* x 6800 rpm, manteniendo la muestra en hielo entre las rupturas. Se centrifugaron los tubos a 14500 g por 5 minutos y el sobrenadante fue trasvasado a otro tubo. Se colocó 1/10 de volumen de *miRNA Homogenate Additive*, se mezcló bien con vórtex y se incubó en hielo 10 minutos. A continuación, se realizó una extracción con fenol ácido – cloroformo y se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo, donde se adicionó 1,25 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló bien y se purificó mediante columnas como indica el fabricante. Las muestras fueron tratadas con DNAsa y luego se eliminó el ARN ribosomal por medio del kit comercial *Ribo-Zero rRNA removal kit* (Illumina Inc.), utilizando una mezcla 1:1 de sondas comerciales de planta y bacteria.

Por otro lado, se obtuvieron las muestras correspondientes a las bacterias en vida libre. Para ello, se realizaron tres cultivos independientes de *R. favelukesii* LPU83, *S. meliloti* 2011, *S. meliloti* Sma818B en medio mínimo VMM hasta llegar a una DO_{600nm} alrededor de 1. Posteriormente, se agregó el reactivo RNA protect (Qiagen) y se cosecharon las células, el pellet obtenido se congeló en nitrógeno líquido. La extracción del ARN se realizó utilizando el kit comercial *RNeasy Protect Bacteria Mini kit* (Qiagen). Se removió el ADN utilizando la DNAsa libre de RNAsa (Thermo Fischer) y se sustrajo el ARN ribosomal con el kit comercial *Ribo-Zero rRNA removal kit* (Illumina Inc.).

II.5.2. Construcción de bibliotecas y secuenciación

Las bibliotecas de ADNc se prepararon con el kit comercial *TrueSeq mRNA Sample preparation (stranded)* (Illumina Inc.) y fueron secuenciadas por medio de la plataforma Illumina (*MiSeq* y *HiSeq*) disponible en el Centro de Biotecnología (CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania).

II.5.3. Procesamiento de los datos de RNA-seq

II.5.3.A. Calidad y mapeos de las muestras

Con la información del secuenciamiento, la calidad de las secuencias generadas fue evaluada con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y las mismas se alinearon con Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) a los genomas de referencia de *R. favelukesii* LPU83 (NCBI Taxonomy ID 348824), *S. meliloti* 2011 (NCBI Taxonomy ID 1286640), *S. meliloti* Sma818B (creado *in silico* con los genomas de Sm2011 y LPU83) y *M. truncatula* A17 (r5.0 V1.8) (Pecrix *et al.*, 2018). Se utilizó la herramienta ReadXplorer (Hilker *et al.*, 2014) para su visualización y para exportar las tablas de números de lecturas crudas por gen.

II.5.3.B. Análisis de expresión diferencial

La normalización de las lecturas obtenidas y el análisis de expresión diferencial para cada tipo de muestra se realizó con DESeq2 (Love *et al.*, 2014). La normalización se realizó independientemente para cada genoma mapeado con los tipos de muestra y replicas correspondientes. Se utilizó la función “*contrast*”, con el parámetro “*LFCThreshold*” en 0,585 y *p-value* en 0,05. Luego, se utilizó la función “*lfcShrink*” del tipo “*ashr*”. Los resultados se exportaron y se filtró cada comparación para finalmente trabajar con aquellos genes con *adjusted p-value* menor a 0,05 y un valor de $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ mayor a 1,5 o menor a -1,5.

II.5.3.C. Análisis de enriquecimiento de genes

Para determinar los términos GO (*gene ontology*) enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados en las muestras de *M. truncatula*, se realizó un análisis de enriquecimiento. Para ello se utilizó ShinyGO 0.8 (Ge S.X. *et al.*, 2019) (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) utilizando el genoma de *M. truncatula* v5.0 y utilizando como valor de FDR 0,05 y tamaño mínimo de vía de 10 genes.

II.6. Proteómica de bacterias en vida libre

Las proteínas expresadas en los mutantes en las peptidasas de LPU83 fueron evaluadas en condiciones de vida libre.

II.6.1. Extracción de proteínas totales para ensayo proteómico

Se cultivaron las cepas mutantes ($\Delta 0539::\Omega\text{Gm}$, $\Delta 1075$ y el doble mutante $\Delta 0539-1075$) y la cepa salvaje de LPU83 en medio TY hasta llegar a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,9-1,1. Se realizaron cuatro réplicas de cada cultivo. Para la extracción de proteínas totales, se utilizó el protocolo puesto a punto en el Laboratorio

de Investigación en Proteómica y Metabolómica del Dr. Karsten Niehaus (CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania). Una vez llegada a la DO deseada, se centrifugaron 2 ml de cultivo a temperatura ambiente durante 3 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se congelaron los *pellets* en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Se resuspendieron los pellets en 100 µl de 100 mM de bicarbonato de amonio en agua Milli-Q. Se agregó 100 µl de TFE (trifluoroetanol, Fluka) y 5 µl de 200 mM de ditioneitol (DTT). Se mezcló por inversión y se coloraron durante 60 min en un bloque térmico a 60 °C con agitación de 300 rpm. Luego, se agregaron 20 µl de 200 mM de iodoacetamida, se mezcló por inversión y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente. La solución restante se dividió en dos tubos, uno se congeló a -20°C como resguardo y se continuó con el protocolo con el tubo restante. Se mezcló con 437 µl de 100 mM de bicarbonato de amonio y luego con 437 µl de agua Milli-Q. Se adicionaron 10 µl de tripsina de concentración 1 µg/µl (Promega Gold) y se incubó durante una noche a 37 °C.

II.6.2. Purificación de muestras e identificación de péptidos por LC/MS-MS

Para purificar las muestras se utilizaron columnas C18 SEP-PAK (Waters). Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a máxima velocidad y se trabajó con el sobrenadante. En primer lugar, se equilibró las columnas con 1 ml de solución B (35% agua miliQ grado MS, 65% de acetonitrilo grado MS y 0,1% de ácido trifluoroacético). Cuando la mayor parte del líquido atravesó la columna, se realizó un lavado con 1 ml la solución A (98% agua Mili-Q grado MS, 2% de acetonitrilo grado MS y 0,1% de ácido trifluoroacético). A la par, se mezcló cada muestra con 1 ml de solución A y luego se cargaron en las columnas. Cuando la mayor parte de la muestra ya atravesó la columna, las mismas se lavaron con 1 ml de solución A. Para eluir las muestras, se realizaron dos agregados sucesivos de 50 µl de solución B y se conectaron en un tubo Eppendorf especial para ensayos proteómicos.

Las muestras se evaporaron en una centrifuga de concentración (Concentrator Plus, Eppendorf) durante 2 horas a 30°C. Se rehidrataron en 12 µl de solución A y se centrifugaron a máxima velocidad durante 2 minutos. Se midió la concentración de proteínas utilizando un espectrofotómetro Nanodrop a 280 nm. Se determinó la cantidad necesaria para preparar tubos de vidrio especiales para Orbitrap con un volumen de 10 µl con una concentración de 1 µg/µl. Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su medición.

Para analizar los péptidos se utilizó un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo Orbitrap Q Exactive Plus LC-MS/MS (Thermo Scientific) acoplado a Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific). En cada corrida se inyectaron 1 µl de muestra y se utilizó una

columna en fase reversa para la elución de estos (C18, 2 μm , 100 Å, 75 μm x 25 cm) Acclaim PepMap RSLC NanoViper (PN 164941). El flujo utilizado fue de 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la polaridad del solvente B varió de: 4% durante los primeros 5 min, 30% desde los 5 min hasta los 65 min, 50% desde los 65 min hasta los 72 min, 95% desde los 72 hasta los 75 min, 95% desde los 75 min hasta los 80 min y 4% desde los 80 a 85 min. Se utilizaron 3,5 Kv para ionizar los péptidos y se realizó un escaneo en el rango 400-900 masa/carga a una resolución de 70.000. Para la identificación de los péptidos se utilizó el método DIA (*Data-independent Acquisition*) (Krasny & Huang, 2021).

II.6.3. Análisis de los datos proteómicos

Los datos obtenidos del Orbitrap se procesaron utilizando el programa Proteome Discoverer (Thermo Fischer) y se asociaron los *hits* con la base de datos UniProt. Los datos se procesaron utilizando el programa Perseus 2.0.11. Para determinar las proteínas diferenciales se realizó un análisis estadístico de dos muestras, comparando las réplicas obtenidas para las células de *R. favelukesii* LPU83 contra aquellas de cada uno de los mutantes estudiados.

II.7. Determinación de nivel de endorreduplicación de los bacteroides

Para determinar el nivel de poliploidía de los bacteroides dentro de los nódulos de *M. truncatula*, se realizaron ensayos en planta infectando las mismas con LPU83, Sm2011 y Sma818B. Los nódulos fueron cortados con bisturí y congelados en hielo seco. Por otro lado, también se realizaron cultivos de estas bacterias en medio TY de los que se tomaron 200 μl del cultivo saturado para su análisis. Posteriormente, se enviaron los nódulos y las bacterias en vida libre al servicio de Citometría de flujo del CNRS - I2BC (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/bioimaging/cytometry/>) que procesó los nódulos según el protocolo descrito por Mergaert *et al.* (2006). Los nódulos fueron trozados en buffer, se filtraron con un filtro de 50 μm de diámetro de poro y se los tiñó con yoduro de propidio previo a su análisis mediante el citómetro de flujo. Las bacterias en vida libre fueron sometidas a un shock térmico de 70° C durante 10 minutos y se las tiñó con yoduro de propidio. Ambas preparaciones fueron evaluadas en su contenido de ADN.

II.8. Herramientas bioinformáticas utilizadas

La caracterización de dominios proteicos se realizó en InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). La comparación de secuencias de nucleótidos o proteínas con distintas bases de datos se llevó a cabo en Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó GraphPad (<https://www.graphpad.com/>) e InfoStat (<https://www.infostat.com.ar/>).

La anotación de los genes de *M. truncatula* se obtuvo de la web correspondiente al genoma (<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/>) y UniProt. Para la anotación de los genes bacterianos se utilizó las bases de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y UniProt.

La asignación de COGs (*cluster of orthologous groups*) se realizó mediante EggNog 5.0 (<http://eggnoq6.embl.de/>) utilizando los proteomas de las bacterias obtenidos de la base de datos UniProt (UniProt, 2023).

Para obtener una tabla de proteínas ortólogas entre *R. favelukesii* y *S. meliloti* se utilizó EDGAR (Blom *et al.*, 2016).

Capítulo III:
**Caracterización de nódulos
eficientes e ineficientes en la fijación
biológica de nitrógeno**



III.1. Introducción

La diferenciación de las bacterias en bacteroides dentro del nódulo implica una serie de cambios genéticos, metabólicos y morfológicos. Dicho proceso de diferenciación se observa fácilmente por la zonificación de los nódulos indeterminados desarrollados en las plantas leguminosas pertenecientes al clado invertido que carece de repeticiones (IRLC por *inverted repeat-lacking clade*), como por ejemplo *Medicago truncatula* y *Medicago sativa*. Cada una de estas zonas se ha clasificado de acuerdo al fenómeno principal que sucede en ellas. La zona I, el meristema, es donde la planta produce continuamente nuevas células. Dichas células se infectan con bacterias (zona II) y comienzan la diferenciación para dar lugar a la zona de fijación de N₂ (zona III). Finalmente, La zona IV es donde se produce la senescencia (Ferguson *et al.*, 2010, Pan & Wang, 2017, Poole *et al.*, 2018). La correcta diferenciación en bacteroides está íntimamente ligada a una fijación biológica del nitrógeno (FBN) eficiente y se evidencia en la zona III, donde las bacterias que infectan la planta ya se han diferenciado a bacteroides, observándose elongados y con un metabolismo activo. A su vez, ha sido descrito que estos bacteroides sufren un proceso de endorreduplicación del ADN, aumentando hasta 24 veces su cantidad de ADN sin dividir las células (Mergaert *et al.*, 2006). Esta diferenciación llega a un estado terminal que no permite que los rizobios aislados de dichos nódulos puedan ser cultivados nuevamente en condiciones de vida libre.

Como hemos mencionado, estudios previos han demostrado que los nódulos desarrollados por *R. favelukesii* en *Medicago* spp. no fijan N₂ de manera eficiente debido a fallas en el desarrollo del nódulo (Wegener *et al.*, 2001). Esto permitiría estudiar los determinantes expresados en nódulos ineficientes (*Rhizobium favelukesii* LPU83, de aquí en adelante **LPU83**) en comparación con los expresados en nódulos eficientes (*Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* 2011, de aquí en adelante **Sm2011**), buscando aquellos necesarios para el proceso de diferenciación. El objetivo de este capítulo es caracterizar en profundidad los nódulos que genera *R. favelukesii* LPU83 en *Medicago truncatula* y en *Medicago sativa* para establecer esta cepa como marcador de una simbiosis ineficiente y que permita, posteriormente, su uso como cepa de referencia en estudios comparativos.

III.2. Caracterización histológica de nódulos de *R. favelukesii* LPU83 mediante microscopía óptica

Como hemos mencionado, los nódulos indeterminados presentan un desarrollo con zonas delimitadas con diferentes características morfológicas, metabólicas y

genéticas. Se decidió estudiar los nódulos desarrollados por LPU83 tanto en *Medicago truncatula* como en *Medicago sativa* con el fin de caracterizar en mayor medida estos nódulos ineficientes en la FBN. Se incorporó la cepa Sm2011 como control del desarrollo de nódulos eficientes en la FBN. A su vez, se utilizó la cepa denominada **Sma818B**, cepa quimérica que desarrolla nódulos ineficientes en alfalfa y, que posee el cromosoma y el pSymB de Sm2011 pero el plásmido simbiótico de LPU83, pLPU83b (Torres Tejerizo *et al.*, 2010). De esta manera, la cepa Sma818B nos permite evaluar la expresión de genes simbióticos de LPU83 en un entorno genético distinto.

Para esta primera aproximación, se realizaron ensayos de nodulación en placas inclinadas de medio Rolfe agarizado para todas las combinaciones de plantas (*Medicago truncatula* y *Medicago sativa*) y bacterias (LPU83, Sm2011 y Sma818B). Asimismo, con el fin de capturar diferentes estadios de desarrollo del nódulo, evaluamos los nódulos a 14, 21 y 31 días post inoculación (dpi). Los nódulos fueron embebidos con resina Technovit 7100, seccionados con micrótopo y teñidos con azul de toluidina, que tiñe membranas y ácidos nucleicos. Como se mencionó en la sección I.3.8, Van de Velde *et al.* (2006) han descrito que en nódulos de *Medicago*, las células infectadas y diferenciadas correctamente se ven celestes y llenas de bacteroides, y que existen tres tipos de células senescentes dependiendo el estado de degradación que presentan. Las células senescentes tipo I se tiñen de un azul más intenso y no se ven completamente llenas; presentan signos de degradación de la bacteria y pérdida del contenido celular, pero mantienen la rigidez. Las células senescentes tipo II pierden la rigidez y se observan colapsadas de color violeta. Las células senescentes tipo III se caracterizan por ser células vacuoladas que no presentan coloración (Figura I.6).

En primer lugar, cabe destacar que los nódulos observados en *M. sativa*, independientemente de la bacteria utilizada, fueron más grandes y elongados que los desarrollados en *M. truncatula* al mismo tiempo post inoculación. A su vez, por lo general los nódulos de LPU83 y Sma818B presentaron menor elongación que los de Sm2011. Los nódulos generados por LPU83 y Sma818B son redondos y blancos, con la particularidad que al pasar el tiempo post inoculación suelen tender a una coloración amarillada, esto podría ser indicio de senescencia en los nódulos. En cambio, los nódulos de Sm2011 son elongados y rosados, indicadores de una correcta FBN.

En *M. sativa*, al ser infectada por Sm2011, se puede observar el tipo de desarrollo normal, con la zonificación típica. A los 14 dpi se observan las zonas I, II y III, sin observarse zona de senescencia (IV) (Figura III.1.A.A). Las células de la planta en la zona III (indicada con una barra verde) se ven llenas de bacteroides elongados teñidos con azul de toluidina. Estas bacterias se observan de azul más claro en toda la célula vegetal. A los 21 dpi no se ven más cambios que el alargamiento de la zona III (Figura

III.1.A.D) y a los 31 dpi comienza a aparecer zona IV (indicada con una barra roja), con la aparición de regiones con células sin teñir (Figura III.1.A.G). Al comparar estos nódulos con los generados por Sma818B, se observa que a 14 dpi estos últimos parecen más ocupadas (Figura III.1.A.C). A diferencia de los nódulos generados por Sm2011, a los 21 dpi comienza a aparecer zona IV (Figura III.1.A.F), donde se observan más células vacías y algunas células infectadas, pero con una mezcla de zonas ocupadas y no ocupadas por bacterias, lo que podría interpretarse como el comienzo de la degradación de los bacteroides. En este tiempo ya se observan células senescentes del tipo I. A 31 dpi, el cambio es mucho más evidente, observando una senescencia avanzada, con muchas más células vacuoladas (senescencia tipo III) y zonas teñidas de un azul muy oscuro (senescencia tipo II) que se asemejan a cúmulos puntuales de bacterias (Figura III.1.A.I). La infección por LPU83 en alfalfa es la que presenta diferencias más drásticas: a 14 dpi se observan numerosas células infectadas, pero, a su vez, ya se evidencia una senescencia clara (Figura III.1.A.B), con células de senescencia tipo I y tipo III (células vacuoladas). A los 21 y 31 dpi, si bien se detectan células vacías y otras infectadas, la tinción da una coloración mucho más intensa, evidenciando diferencias entre las infecciones y los tres tipos de células senescentes (Figuras III.1.A.E y III.1.A.H). A su vez, esta coloración no es uniforme dentro de las células vegetales, sino que se observa el centro de la célula más oscuro, sugiriendo que las bacterias no se encuentran distribuidas homogéneamente dentro de la misma.

En paralelo, se evaluó la infección en *M. truncatula* que, como se mencionó, genera nódulos más pequeños al mismo tiempo post inoculación. Al ser infectada por Sm2011 se puede observar a 14 dpi el tipo de desarrollo normal, con zonas I y II presentes y una pequeña zona III que empieza a desarrollarse (Figura III.1.B.A). Esta zona se ve claramente a los 21 y 31 dpi, con su azul más claro (Figuras III.1.B.D y III.1.B.G). En la infección con Sma818B, a 14 dpi ya se ven muchas más zonas alteradas y no se observan todavía células teñidas azul claro, indicando que la zona III todavía no apareció (Figura III.1.B.C). A 21 dpi se observan más de este tipo de células, pero comienzan a observarse células de senescencia tipo I y tipo III (Figura III.1.B.F). A 31 dpi la senescencia es clara, con los tres tipos de células senescentes (Figura III.1.B.I). Por último, la infección con LPU83, similar a lo observado con Sma818B, no presenta a 14 dpi una zona III típica, con células celestes, sino que se encuentran células teñidas de un azul intenso (Figura III.1.B.B). Lo mismo se observa a 21 dpi y, a 31 dpi, la senescencia es evidente, con zonas vacías o teñidas muy intensamente (Figuras III.1.B.E y III.1.B.H).

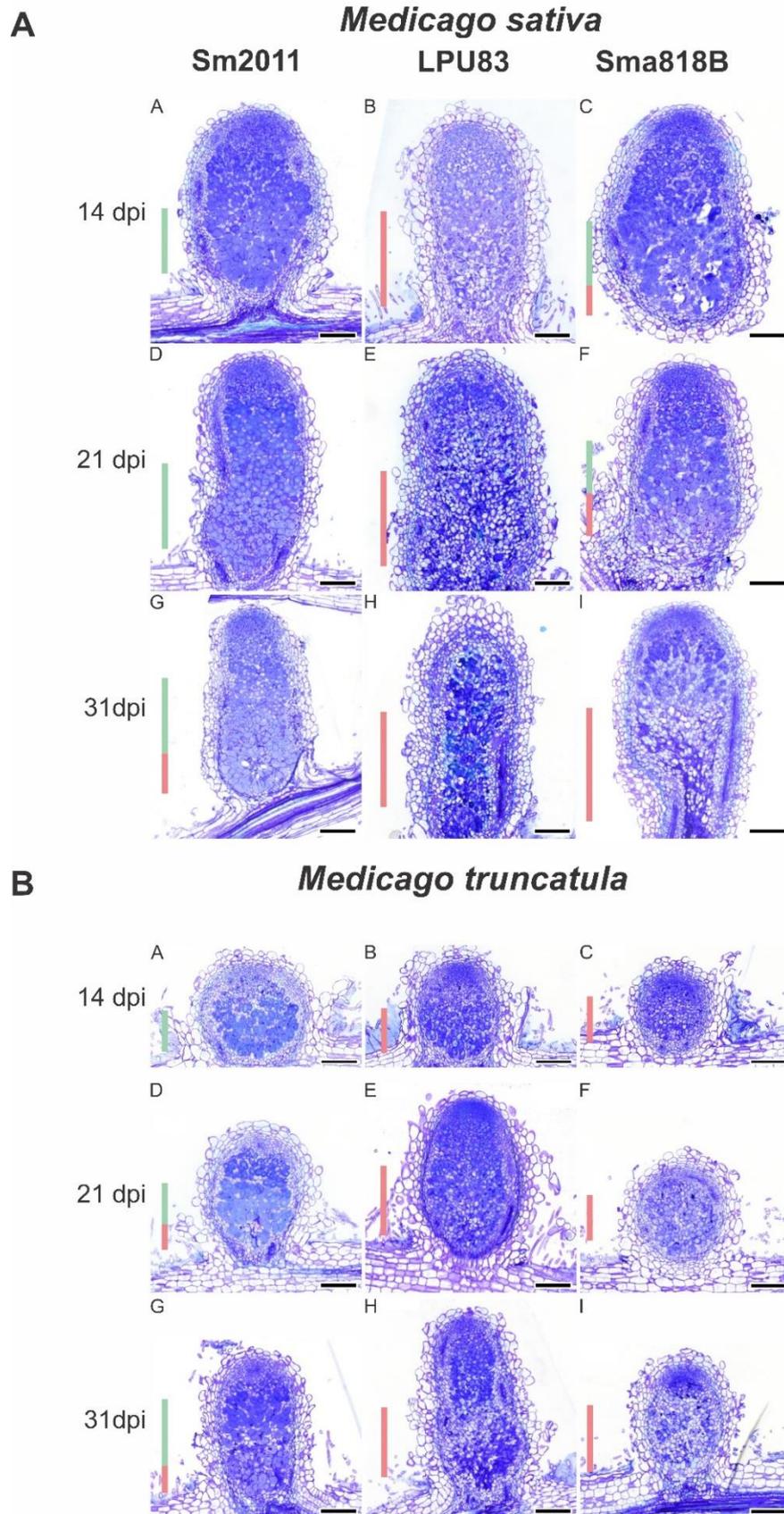


Figura III.1. Microscopía óptica de los nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno. A. Nódulos de *M. sativa* y **B.** Nódulos de *M. truncatula* a 14 (A-C), 21 (D-F) y 31 dpi (G-I) infectados por *S. meliloti* 2011, *R. favelukesii* LPU83 y *S. meliloti* Sma818B. Líneas verticales verdes indican la zona de fijación de N_2 (zona III) y líneas rojas la zona de senescencia (zona IV). La escala se muestra como una barra negra horizontal en cada figura e indica 100 μm .

La observación microscópica con mayor aumento de las células de la zona III de *M. truncatula* demostró, como ha sido descrito en numerosas ocasiones, que los bacteroides de Sm2011 se encuentran alargados ocupando todo el citoplasma de la célula de la planta con un color celeste (Figura III.2.A). En las células infectadas por LPU83, se observan zonas sin ocupar y otras zonas donde las bacterias se ven redondeadas, sin elongación y de un azul mucho más intenso (Figura III.2.B). En la infección con Sma818B se ve un fenotipo similar a la infección con LPU83, con bacterias redondeadas e intensamente coloreadas (Figura III.2.C).

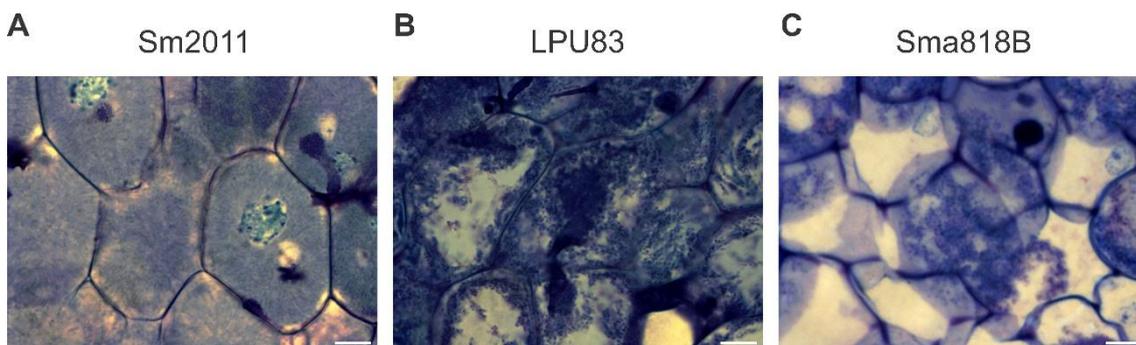


Figura III.2. Células simbióticas de la zona III de nódulos de *M. truncatula* observados al microscopio óptico. **A.** Nódulos de *S. meliloti* 2011, **B.** Nódulos de *R. favelukesii* LPU83 y **C.** Nódulos de *S. meliloti* Sma818B. La escala se muestra como una barra blanca e indica 10 μm .

La tinción con azul de toluidina, que tiñe membranas y ácidos nucleicos, nos muestra una mayor densidad de estos componentes en los nódulos de LPU83. A partir de estas observaciones, se observa que en la infección tanto por LPU83 como por Sma818B, la senescencia comienza de manera temprana y las bacterias no se elongan. Esta senescencia temprana genera el interrogante de si estas bacterias se encuentran metabólicamente activas o si están siendo activamente degradadas dentro de la planta.

III.3. Caracterización de la estructura de nódulos y el estado fisiológico de las bacterias mediante microscopía confocal

Como se mencionó previamente, los nódulos de LPU83 suelen tener una coloración oscura a los 31 dpi. Esta puede deberse a una senescencia temprana de los nódulos, probablemente por la activación de una respuesta de defensa de la planta. Esto llevaría a una muerte temprana de las bacterias dentro del nódulo. Para determinar si los bacteroides se encontraban metabólicamente activos dentro de los nódulos repetimos los ensayos de plantas y evaluamos, para todas las combinaciones de plantas (*M. truncatula* y *M. sativa*) y bacteria (LPU83, Sm2011 y Sma818B) a distintos tiempos post inoculación (dpi), el estado de las bacterias mediante microscopía confocal utilizando la tinción “vivas/muertas” (Thermo Fisher), la cual utiliza Syto9 y yoduro de propidio. Syto9 es un colorante (fluorescencia verde) que se une al ADN y permea

fácilmente la membrana bacteriana; el ioduro de propidio (fluorescencia roja) también se une al ADN, pero solamente puede permear en células que tengan daños en sus membranas. Cuando ambos colorantes se encuentran en la célula, el ioduro de propidio reduce la fluorescencia del Syto9; por ende, bacterias con la membrana dañada (o muertas) se observan rojas y bacterias vivas se observan verdes.

En la Figura III.3 se observan nódulos en *M. sativa* a 10 y 31 dpi. Cuando infecta Sm2011, en ambos tiempos (Figura III.3.A.A-C y Figura III.3.B.A-C) se observa el nódulo ocupado por células infectadas con bacteroides metabólicamente activos (verdes) y elongados, sin signos de senescencia ni bacterias teñidas de rojo que indiquen la muerte de las mismas. En el caso de Sma818B, a 10 dpi se observa un desarrollo casi normal: aparecen bacteroides elongados, pero no ocupan completamente la célula de la planta (Figura III.3.A.G-I). Sin embargo, a 31 dpi, se observan alteraciones en el nódulo y aparición de bacterias muertas (teñidas de rojo) (Figura III.3.B.G-I). Con LPU83 a ambos tiempos se observan células vacías y bacterias pequeñas sin elongar. Si bien se observan algunas células rojas, predominan las células vivas (Figura III.3.A.D-F y Figura III.3.B.D-F).

Cuando se observan los nódulos de *M. truncatula* (nuevamente más pequeños que los de *M. sativa*), Sm2011 infectó eficientemente, siempre con bacteroides elongados y metabólicamente activos en ambos tiempos (Figura III.4.A.A-C y Figura III.4.B.A-C). Sma818B muestra una mejor distribución en el nódulo en general, sin embargo, se observan fallas en la diferenciación, con muchas células de apariencia vacía. A 10 dpi, Sma818B no parece elongarse (Figura III.4.A.G-I); llamativamente, sí se observa elongación a 31 dpi a pesar de la presencia de zonas de aspecto vacío (Figura III.4.B.G-I). Los nódulos de LPU83 tampoco están totalmente ocupados en comparación con aquellos de Sm2011, y los bacteroides no se observan alargados. Luego de 31 dpi se observa una clara senescencia de los nódulos generados por LPU83, donde se detectó un gran porcentaje de células muertas teñidas con ioduro de propidio, probablemente por una respuesta de defensa de la planta (Figura III.4.A.D-F y Figura III.4.B.D-F).

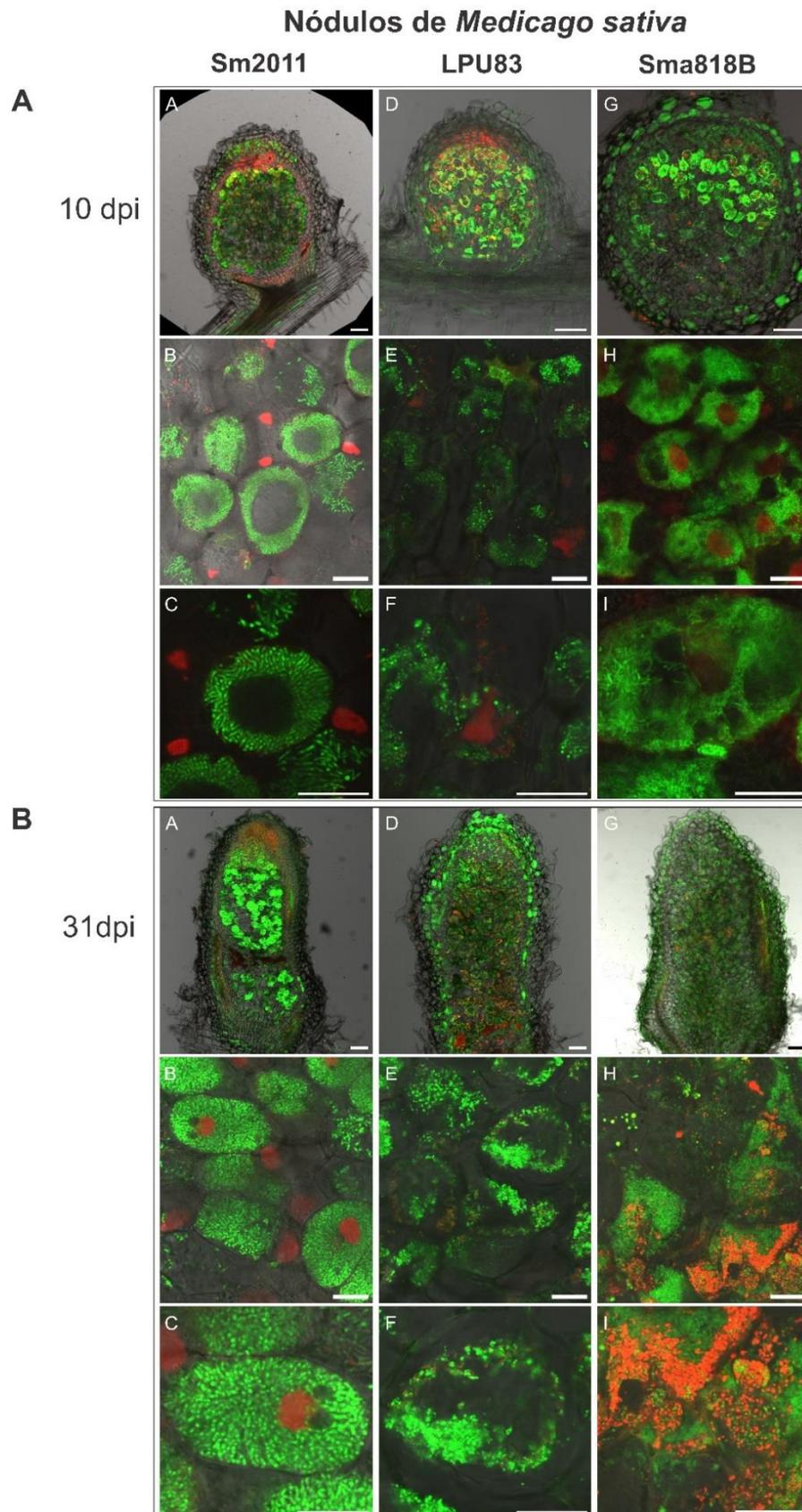


Figura III.3. Secciones de nódulos eficientes e ineficientes de *M. sativa* a distintos tiempos post inoculación. Nódulos de *Medicago sativa* infectados con *S. meliloti* 2011 (A-C), *R. favelukesii* LPU83 (D-F) y *S. meliloti* Sma818B (G-I) a **A.** 10 dpi y **B.** 31 dpi. Las imágenes corresponden a microscopía confocal de los nódulos teñidos con Syto9 e ioduro de propidio. La escala se muestra como una barra blanca en cada imagen e indican: 100 μm (A, D y G) y 20 μm en el resto de las imágenes.

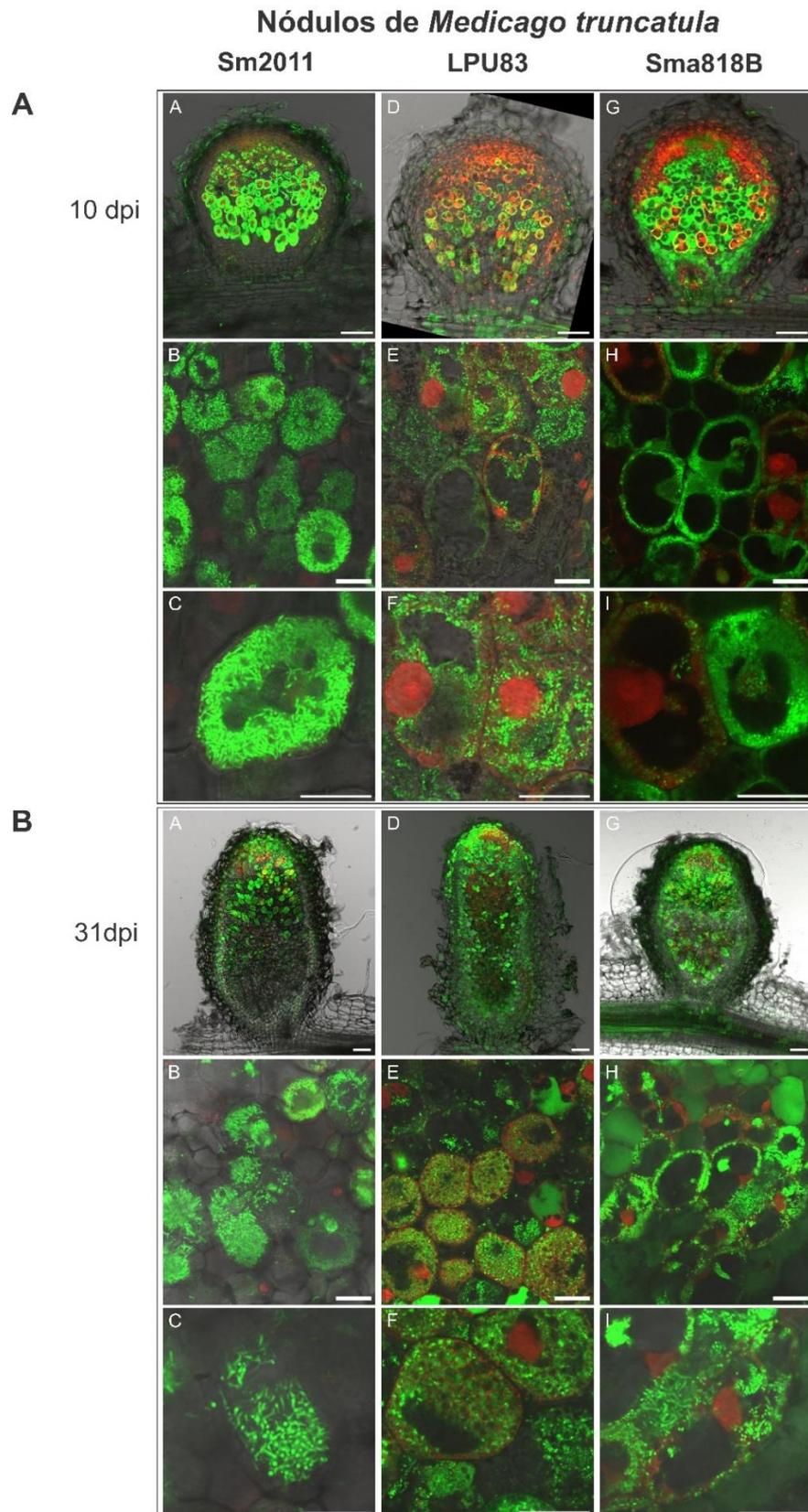


Figura III.4. Secciones de nódulos eficientes e ineficientes de *M. truncatula* a distintos tiempos post inoculación. Nódulos de *Medicago truncatula* infectados con *S. meliloti* 2011 (A-C), *R. favelukesii* LPU83 (D-F) y *S. meliloti* Sma818B (G-I) a **A.** 10 dpi y **B.** 31 dpi. Las imágenes corresponden a microscopía confocal de los nódulos teñidos con Syto9 e ioduro de propidio. La escala se muestra como una barra blanca en cada imagen e indican: 100 μm (A, D y G) y 20 μm en el resto de las imágenes.

III.4. Conclusiones parciales

Medicago sativa y *Medicago truncatula* generan nódulos del tipo indeterminados. Estos nódulos presentan bacteroides que sufren una diferenciación terminal (Mergaert *et al.*, 2006). Si bien había evidencias previas de que *R. favelukesii* genera nódulos defectivos en la simbiosis con alfalfa y la FBN es escasa (Wegener *et al.*, 2001), no se había caracterizado en profundidad a qué nivel del desarrollo del nódulo se observan estas fallas. Con el objetivo de establecer un modelo de desarrollo de nódulo defectivo donde las bacterias no logren diferenciarse en bacteroides, se evaluó en profundidad el desarrollo del nódulo por la cepa LPU83 y la cepa Sma818B.

Los resultados presentados en este capítulo evidencian una falla en la diferenciación de los bacteroides, que no se encuentran elongados, como observamos mediante distintos tipos de microscopía. Los nódulos de LPU83, ya sea con *Medicago sativa* o *Medicago truncatula*, comenzarían de manera temprana la etapa de senescencia. En general, en *M. truncatula* los fenotipos fueron más severos que en *M. sativa*. La cepa quimérica Sma818B presenta un fenotipo similar a LPU83, pero en *M. sativa* la senescencia es más tardía y en algunos casos las bacterias parecen elongarse. Sin embargo, no ocupan la célula de la planta en su totalidad. Esto sugeriría que algún determinante del pSymA necesario para la simbiosis se encuentra ausente en pLPU83b, o que algo de este está afectando negativamente la simbiosis.

Estos resultados también nos permiten confirmar que LPU83 es un buen candidato para su utilización como cepa de referencia para estudios comparativos entre nódulos eficientes e ineficientes en la FBN. Esta cepa es capaz de nodular, los bacteroides se encuentran dentro de las células vegetales y, sin embargo, no logran la diferenciación completa en bacteroide. La comparación de nódulos de LPU83 con aquellos formados por Sm2011, una cepa eficiente en la FBN, permitirá encontrar determinantes necesarios para la diferenciación de los bacteroides. En el próximo capítulo, se llevará a cabo una aproximación transcriptómica para identificar estos determinantes.

Capítulo IV:
**Estudio de nódulos eficientes e
ineficientes en la fijación de nitrógeno
mediante transcriptómica dual**



IV.1. Introducción

Medicago truncatula es una de las plantas modelo para el estudio de la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Una característica clave de su amplio empleo es que su genoma, de pequeño tamaño en comparación con el de otras leguminosas estudiadas, se encuentra secuenciado. En los últimos años, numerosos estudios transcriptómicos han sido realizados a partir de nódulos de esta leguminosa, demostrando que una gran cantidad de genes son necesarios para el correcto desarrollo de este órgano (Maunoury *et al.*, 2010, Roux *et al.*, 2014, Pereira *et al.*, 2024). Se ha demostrado que las células vegetales de los nódulos presentan dos marcados cambios transcriptómicos durante su desarrollo, acoplados tanto a la diferenciación de las células vegetales como a la de los bacteroides (Maunoury *et al.*, 2010, Roux *et al.*, 2014). En cuanto a los bacteroides, fueron realizados estudios transcriptómicos enfocados en las bacterias simbiotes, determinando también una numerosa cantidad de genes bacterianos expresados a distintos tiempos (Capela *et al.*, 2006) y en diferentes zonas del nódulo (Roux *et al.*, 2014). Trabajos recientes han mostrado la respuesta de los nódulos a estreses tanto bióticos como abióticos (Sauviac *et al.*, 2022). Habiendo establecido el modelo comparativo de nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno y con el fin de continuar su estudio, en este capítulo se evaluará el transcriptoma de nódulos de *M. truncatula* infectados por *S. meliloti* 2011, *R. favelukesii* LPU83 y la cepa quimérica *S. meliloti* Sma818B.

IV.2. Esquema experimental y secuenciación masiva

Para avanzar con la búsqueda de determinantes involucrados en la diferenciación de los bacteroides y caracterizar en mayor medida la respuesta de *Medicago truncatula* a LPU83, se realizó un ensayo de transcriptómica dual de nódulos infectados por LPU83, Sm2011 y Sma818B. Para cada tipo de nódulo se utilizaron dos tiempos de cosecha distintos: 10 y 31 días post inoculación (dpi). Se ha descrito que en estos tiempos post inoculación se observan los mayores cambios transcripcionales dentro de los nódulos (Maunoury *et al.*, 2010). En la figura IV.1 se muestra un esquema general del flujo de trabajo realizado. Por otro lado, para poder comparar la expresión de genes de las bacterias dentro y fuera de los nódulos, también se realizó una extracción de ARN de bacterias en vida libre. Para ello, se utilizaron cultivos de las bacterias (LPU83, Sm2011 y Sma818B) en medio mínimo VMM (Vincent, 1970). Cabe mencionar que se utilizó el mismo medio de cultivo que el utilizado por Capela *et al.* (2006) al estudiar los transcriptomas de Sm2011 por *microarrays*. Para cada condición, tanto de muestras de nódulos como de cultivo de bacterias, se realizaron tres réplicas biológicas. Posterior a

la extracción y al análisis de calidad del ARN, se realizó una biblioteca de ADNc que fue luego secuenciada mediante Illumina (realizado por el servicio de secuenciación del CeBiTeC, Bielefeld, Alemania). El mapeo de las lecturas con los genomas de *M. truncatula*, LPU83, Sm2011 y Sma818B mostró un rango de lecturas totales que va desde 14 hasta 160 millones de lecturas por muestra, como se detalla en la tabla IV.1. Se realizó la normalización de las lecturas, el análisis de expresión diferencial de genes mediante DESeq2 (Love *et al.*, 2014) y un análisis de enriquecimiento de estos genes mediante ShinyGO (Ge S.X. *et al.*, 2019) o mediante su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COGs, *Cluster of orthologous groups*) (Tatusov *et al.*, 1997). El análisis de la transcriptómica se ha dividido en dos secciones: la primera, los resultados de la expresión de los genes de la planta y, la segunda, de las bacterias utilizadas.

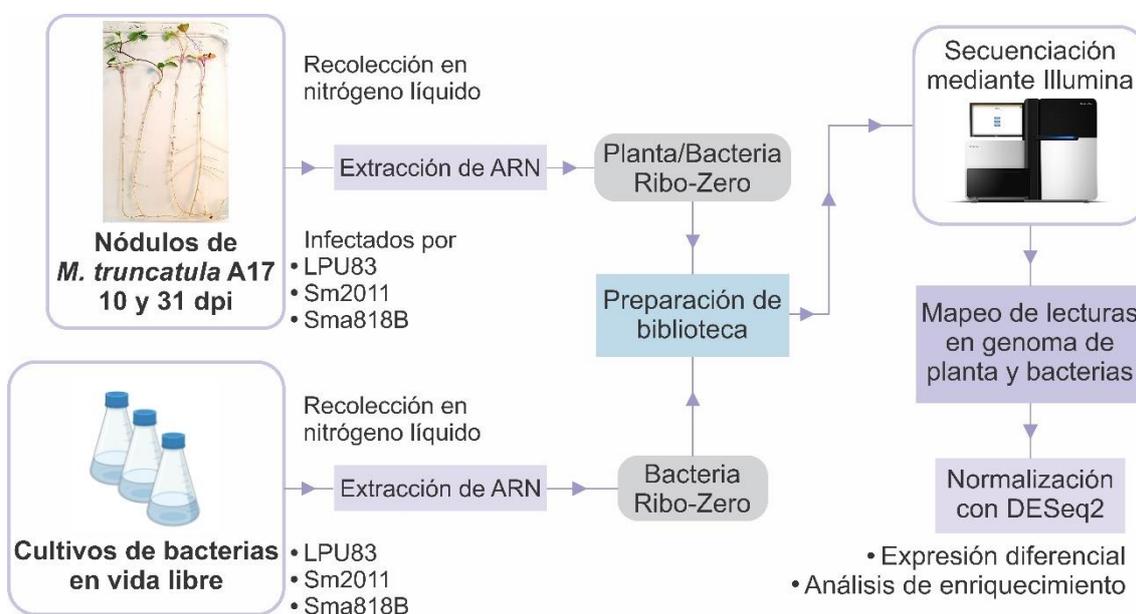


Figura IV.1. Esquema de trabajo para el ensayo de transcriptómica dual. Se esquematiza en forma breve los pasos que se llevaron a cabo para la obtención del ARN, preparación de las bibliotecas y secuenciación de las muestras realizadas. Los nódulos infectados por los distintos tipos de rizobios se cosecharon y se les realizó una extracción de ARN, que incluye tanto el ARN de las células vegetales, como el de las bacterias presentes en los nódulos. Los cultivos de las bacterias en vida libre se congelaron en nitrógeno líquido y se les extrajo el ARN. En ambos tipos de muestras, se utilizaron kits comerciales para la eliminación del ARN ribosomal y luego se preparó la biblioteca de ADNc, para posteriormente secuenciar mediante Illumina. Se realizó un control de calidad de los datos para luego pasar al mapeo de las lecturas sobre los genomas de planta y bacterias. Con las lecturas mapeadas se procedió a realizar una normalización con DESeq2, el cual permitió también realizar un análisis de expresión diferencial de genes. Finalmente, se realizaron distintos análisis de enriquecimiento de vías funcionales.

Tabla IV.1. Comparación de la secuenciación de cada una de las muestras realizadas. Número de lecturas mapeadas por genoma y réplica para cada muestra secuenciada.

Muestra	Tiempo	Replica	<i>M. truncatula</i>	Bacteria
LPU83 - Nódulos	10 dpi	1	162.615.950	688.673
		2	174.879.885	844.631
		3	158.490.180	1.353.391
	31 dpi	1	106.933.987	10.047.520
		2	86.989.103	3.751.692
		3	47.030.078	2.494.646
Sm2011 - Nódulos	10 dpi	1	78.262.205	7.291.143
		2	101.607.729	2.897.272
		3	78.292.790	9.519.687
	31 dpi	1	93.039.073	17.390.201
		2	60.180.140	9.641.283
		3	34.882.716	5.990.922
Sma818B - Nódulos	10 dpi	1	149.854.625	1.059.739
		2	178.139.129	1.874.670
		3	165.258.526	1.054.823
	31 dpi	1	103.611.948	8.145.200
		2	78.513.223	3.037.623
		3	36.013.840	1.555.334
LPU83 - Vida libre		1	-	14.293.569
		2	-	13.051.347
		3	-	14.504.002
Sm2011 - Vida libre		1	-	16.809.337
		2	-	15.559.939
		3	-	14.195.661
Sma818B- Vida libre		1	-	18.155.307
		2	-	18.594.932
		3	-	19.805.207

IV.3. Estudio del transcriptoma de *M. truncatula* en nódulos eficientes e ineficientes

IV.3.1. Análisis general del transcriptoma de *M. truncatula*

El genoma de *M. truncatula* posee anotados 51.160 genes, de los cuales se identificaron en la transcriptómica de los nódulos 43.991, un 86% de los mismos. Las lecturas mapeadas al genoma se graficaron en *heatmap* donde se muestran las distancias entre las réplicas de cada condición y un análisis de componentes principales de las mismas (Figura IV.2). Los análisis mencionados permiten observar a gran escala la dispersión de las muestras y que las réplicas realizadas sean consistentes. En el gráfico de la figura IV.2.A, se observa que hay una clara división marcada por el tiempo post inoculación al que fueron cosechados, 10 o 31 dpi. Asimismo, en cada uno de los

agrupamientos, las muestras de nódulos ineficientes se separan de las de nódulos eficientes. Cada réplica biológica se agrupó con las mismas de su condición, evidenciando una calidad satisfactoria del ensayo en general.

Mediante un análisis de componentes principales (PCA, por *principal component analysis*) se observa el agrupamiento de las réplicas para cada una de las muestras obtenidas (Figura IV.2.B). En la esquina superior izquierda se agrupan las réplicas correspondientes a 31 dpi y, en la esquina inferior derecha aquellas a 10 dpi. Por otro lado, se observa un agrupamiento de las réplicas correspondientes a los nódulos infectados por LPU83 y Sma818B, ambos con fenotipo Fix⁻, en el extremo superior derecho del gráfico (Figura IV.2.B), indicando que tienen una menor varianza entre ellos. En conclusión, estos análisis demostraron que las réplicas biológicas obtenidas son correctas y que las muestras presentan diferencias dependiendo de la cepa utilizada y del tiempo de cosecha empleado.

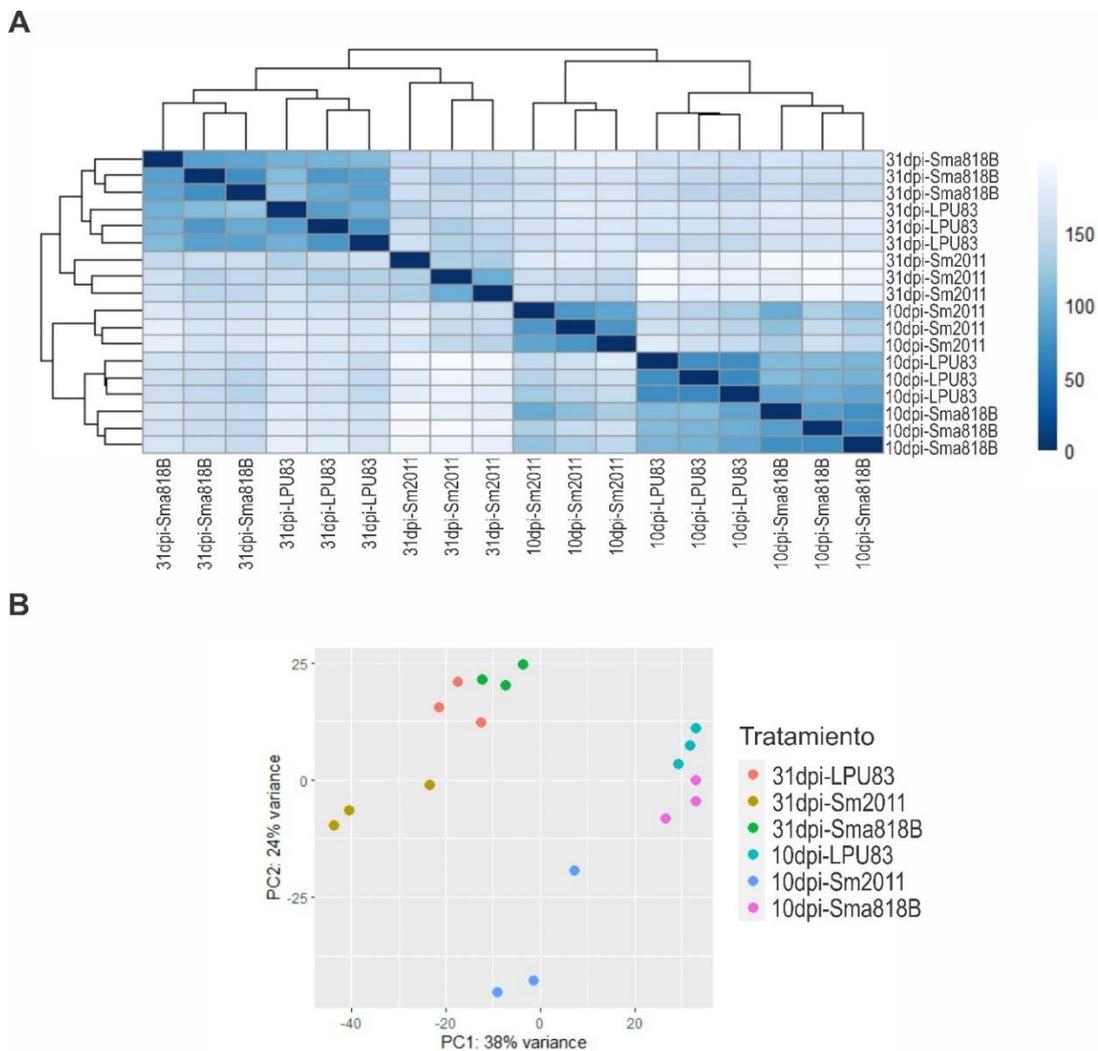


Figura IV.2. Análisis general del transcriptoma de *M. truncatula*. **A.** Heatmap de distancias entre las muestras de los nódulos de *M. truncatula* infectados con las distintas cepas y a distintos tiempos. **B.** Análisis de componentes principales de las tres réplicas de cada uno de los tratamientos.

Para determinar los genes diferenciales entre las distintas condiciones estudiadas, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes utilizando DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Se estableció como criterio general que para tener una diferencia estadísticamente significativa el valor de *adjusted p-value* debe ser menor a 0,05 y a su vez un *Log₂FoldChange* menor a -1,5 o mayor a 1,5, lo que equivale a una razón de cambio de casi 3 veces la expresión ($\approx 2,83$).

Se realizaron dos tipos de comparaciones: las combinaciones entre las muestras de las distintas cepas inoculadas a un mismo tiempo (10 o 31 dpi) y la comparación entre nódulos infectados por la misma bacteria, pero comparando nódulos de 10 y 31 dpi. Para el caso de las comparaciones entre cepas, a los distintos tiempos se encontraron más de 900 genes expresados diferencialmente (GEDs) en la mayoría de las comparaciones (Tabla IV.2). La lista de genes diferenciales de *M. truncatula* para cada una de las comparaciones se encuentra en el Anexo (Tablas A1-A9). Como era de esperarse, se obtiene una mayor cantidad de GEDs al comparar nódulos Fix⁺ contra nódulos Fix⁻, comparaciones que se dan entre Sm2011 contra LPU83 o Sma818B (Tabla IV.2). Al comparar los nódulos infectados por LPU83 contra aquellos generados por Sma818B encontramos numerosos genes diferencialmente expresados a pesar de que ambas cepas generan nódulos Fix⁻. La comparación entre Sm2011 y Sma818B nos indica que gran parte de las diferencias en la planta en respuesta a las cepas se debe a sus plásmidos simbióticos, ya que hay ca. 2000 genes diferenciales tanto a 10 dpi como a 31 dpi al comparar dichos nódulos (Tabla IV.2). Por otro lado, el estudio del cambio en la expresión genética al comparar nódulos de 31 dpi contra 10 dpi, infectados por la misma cepa, mostró que hay una mayor cantidad de genes que se expresan más a los 31 dpi, superando los 2500 genes cuando infectó Sm2011 y superando los 3600 genes para el caso de LPU83 y Sma818B (Tabla IV.3). En los tres casos, la cantidad de genes diferenciales con mayor expresión a los 10 dpi es menor, siendo entre 800 y 1400 genes.

Tabla IV.2. Comparaciones entre los nódulos infectados por las distintas cepas a 10 y 31 dpi. Genes expresados diferencialmente en los nódulos de *M. truncatula* al comparar nódulos al mismo tiempo post inoculación, 10 o 31 dpi, comparando entre dos tipos de nódulos distintos. Se consideran expresados diferencialmente a aquellos genes con *adjusted p-value* menor a 0,05 y *Log₂FoldChange* menor a -1,5 o mayor a 1,5.

Comparación	Condición	
	10 dpi	31 dpi
Nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011	2946	1917
Nódulos LPU83 contra Nódulos Sma818B	916	222
Nódulos Sma818B contra Nódulos Sm2011	1925	2346

Tabla IV.3. Diferencias en la expresión genética al comparar nódulos de 31 dpi contra 10 dpi. Genes de *M. truncatula* expresados diferencialmente al comparar la expresión de genes a 31 dpi contra 10 dpi en nódulos infectados por la misma cepa bacteriana, LPU83, Sm2011 o Sma818B. Genes con *adjusted p-value* menor a 0,05 y *Log₂FoldChange* menor a -1,5 o mayor a 1,5.

Condición	LPU83	Sm2011	Sma818B
Mayor expresión a 31 dpi (<i>Log₂FC</i> >1,5)	3035	2163	2890
Mayor expresión a 10 dpi (<i>Log₂FC</i> <-1,5)	1179	876	1364

Se realizó un diagrama tipo *Upset plot*, que permite ver de manera gráfica la cantidad de genes diferenciales compartidos entre todas las comparaciones realizadas (Figura IV.3). Estos genes se dividieron en dos grupos, dependiendo si tenían mayor expresión en la condición A (*Log₂FoldChange* mayor a 1,5) o en la condición B (*Log₂FoldChange* menor a -1,5), indicados en color rojo y azul, respectivamente, en el gráfico de barras presente en el panel izquierdo de la figura IV.3. En la matriz de intersecciones del gráfico, se muestran los primeros 40 grupos de intersecciones encontrados, indicando con puntos negros unidos con líneas las condiciones en las que se comparten genes diferenciales con similar perfil de expresión. El total de genes compartidos en cada uno de estos grupos de genes se indica en el gráfico de barras en la parte superior de la figura IV.3. De acuerdo con estas agrupaciones de genes con perfiles similares se estudiaron las posibles respuestas que podrían involucrar dichos genes. Para esto, se realizaron análisis de enriquecimiento de acuerdo a los términos GO (*Gene Ontology*) (Ashburner *et al.*, 2000, Ge S.X. *et al.*, 2019) de los genes compartidos entre estas condiciones.

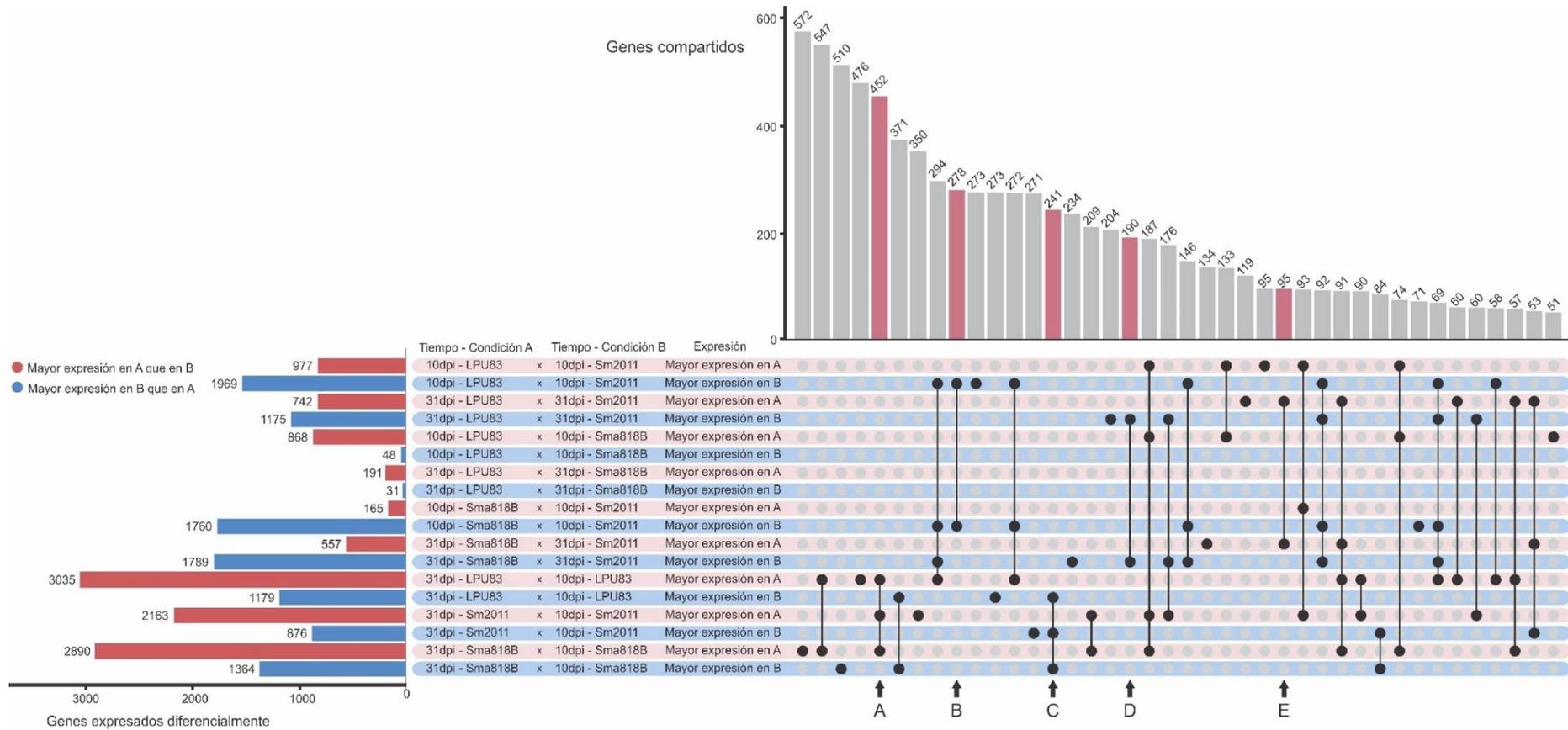


Figura IV.3. UpSet plot de los genes expresados diferencialmente en las distintas comparaciones realizadas. GEDs presentes en una o más condiciones, comparaciones indicadas como “Tiempo-Condición A x Tiempo-Condición B”. Los genes diferenciales de las distintas comparaciones con $Log_2FoldChange$ mayor a 1,5 se indican como “Mayor expresión en A” y aquellos con $Log_2FoldChange$ menor a -1,5 como “Mayor expresión en B”. La matriz de intersecciones indica con círculos negros unidos (o no) por líneas las comparaciones que presentan genes en común. La cantidad de genes compartidos se indica en el gráfico de barras en la parte superior de la figura con el número de genes compartidos para cada intersección en la parte superior de la barra correspondiente, se indican en color rosa y flechas con letras los grupos de genes a los que se hace referencia en el texto principal.

IV.3.1.A. Respuesta general al desarrollo del nódulo

Al comparar los nódulos infectados por la misma cepa a 31 dpi contra 10 dpi se observa que hay dos grupos de genes diferenciales compartidos: unos que aumentan su expresión a 31 dpi y otros en los que la expresión es mayor a 10 dpi. Esta condición se da para las tres cepas bacterianas utilizadas como inóculo: Sm2011, LPU83 y Sma818B. Estos grupos (indicados en la Figura IV.3 como A y C) constan de genes con mayor expresión a 31 dpi o a 10 dpi y presentan 452 y 241 genes, respectivamente. La lista de genes se encuentra en el Anexo (Tablas A10-A11). De esta manera, estos genes estarían involucrados en la respuesta general de *M. truncatula* a los rizobios, independientemente de si estos nódulos son eficientes o no en la fijación de nitrógeno. Mediante un análisis de enriquecimiento se determinó que los procesos biológicos enriquecidos a los 10 dpi son en su mayoría procesos relacionados con la biosíntesis de lípidos, metabolismo del ADN y ARN, y biosíntesis de diterpenos, compuestos clave en la respuesta de la planta tanto a factores bióticos como abióticos (Hendrickson *et al.*, 2024) (Tabla IV.4). En cambio, el análisis de enriquecimiento de los genes con mayor expresión a 31 dpi muestra procesos biológicos relacionados al transporte y metabolismo de la membrana celular (Tabla IV.4). A 31 dpi se encuentra enriquecida la vía de biosíntesis de chalconas, precursores de los flavonoides (Zhang *et al.*, 2009). A su vez se ha descrito que las chalconas actúan como activadores de la vía de factores de nodulación en *S. meliloti* (Wu *et al.*, 2024).

Tabla IV.4. Análisis de enriquecimiento de genes involucrados en la respuesta general al desarrollo del nódulo en *M. truncatula*. De acuerdo a la categoría de GO “procesos biológicos” se listan los primeros 10 procesos enriquecidos para cada grupo de genes, con mayor expresión a 10 dpi y mayor expresión a 31 dpi. Se indican la cantidad de genes presentes en estos grupos que pertenecen al proceso, la cantidad de genes que presenta el proceso general y el “*Fold Enrichment*”, que mide la magnitud del enriquecimiento con respecto al total de genes de la planta. Todas las vías son significativas con FDR (“*false discovery rate*”) menor a 0,05.

	Proceso biológico	Término GO	N° de genes	N° genes en la vía	<i>Fold Enrichment</i>
Mayor expresión a 10 dpi	Proceso biosintético de diterpenoides	GO:0016102	8	44	39,8
	Proceso biosintético de pirimidinas "de novo"	GO:0006207	2	15	29,2
	Proceso biosintético de lípidos	GO:0008610	2	16	27,3
	Proceso metabólico de ácidos grasos	GO:0006631	2	17	25,7
	Fosforilación de nucleósidos monofosfato	GO:0046940	2	22	19,9
	Sulfatación	GO:0051923	2	25	17,5
	Transporte de xenobióticos	GO:0042908	4	100	8,7
	Integración del ADN	GO:0015074	6	205	6,4
	Proceso biosintético del ADN dependiente de ARN	GO:0006278	9	318	6,2
	Hidrolisis-endonucleolítica del enlace fosfodiéster del ARN	GO:0090502	6	332	4,0

	Proceso biológico	Término GO	N° de genes	N° genes en la vía	Fold Enrichment
Mayor expresión a 31 dpi	Proceso biosintético de chalconas	GO:0009715	5	11	53,0
	Proceso biosintético de policétidos	GO:0030639	5	30	19,4
	Secuestro intracelular de iones de hierro	GO:0006880	3	19	18,4
	Vía de señalización de receptores de superficie celular	GO:0007166	7	63	13,0
	Proceso biosintético de flavonoides	GO:0009813	5	49	11,9
	Transporte iónico transmembrana	GO:0034220	4	65	7,2
	Reconocimiento del polen	GO:0048544	11	187	6,9
	Proceso biosintético	GO:0009058	4	73	6,4
	Fosforilación de proteínas	GO:0006468	54	1815	3,5
	Metilación	GO:0032259	11	485	2,6

IV.3.1.B. Respuesta en nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno

La comparación entre nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno, en este caso Sm2011 contra LPU83 o Sma818B, generó dos grupos de genes compartidos en estas dos comparaciones que se expresan en mayor medida en los nódulos de Sm2011: uno correspondiente a 10 dpi (grupo B de la figura IV.3) y otro de genes expresados en nódulos eficientes a 31 dpi (grupo D en la figura IV.3). Estos grupos contienen 278 y 190 genes, respectivamente. Las tablas de genes completas se encuentran en el Anexo (Tablas A12-A13). A 10 dpi, el análisis de enriquecimiento de términos GO muestra que la única función molecular enriquecida de manera significativa es la correspondiente al GO:0046872 “unión a iones metálicos”, con una tasa de enriquecimiento (*Fold Enrichment*) de 4,4 (Tabla IV.5). De los 67 genes enriquecidos en esta categoría, 57 corresponden a péptidos ricos en cisteína específicos de nódulos (NCRs) y el resto a proteínas hipotéticas con funciones variadas. Este resultado indicaría que a 10 dpi la respuesta que prevalece en los nódulos eficientes es el aumento en la expresión de los genes que codifican para NCRs, necesarios para el proceso de diferenciación de los bacteroides (Pan & Wang, 2017). En los nódulos eficientes de 31 días se observan distintos términos GO enriquecidos en las categorías procesos biológicos y función molecular (Tabla IV.5). En la primera categoría, se encuentra enriquecida la vía reductora de las pentosas fosfato indicando una buena fijación de carbono, también se encuentra enriquecido el proceso asociado a “respuesta a estrés” por parte de la planta, también relacionado al proceso de simbiosis. Por otro lado, entre las funciones enriquecidas en función molecular, se encuentran vías relacionadas con la fotosíntesis y la fijación de carbono por parte de la planta, todas relacionadas a un desarrollo normal (y eficiente) de la misma. Nuevamente, se encuentra enriquecida la categoría correspondiente a unión de iones metálicos, en la que se clasifican los genes

que codifican para NCRs, aunque en este caso sólo con 20 genes presentes de esta vía, un menor número que lo observado a 10 dpi.

Tabla IV.5. Análisis de enriquecimiento de la respuesta de *M. truncatula* frente a nódulos eficientes en la FBN. Vías enriquecidas para dos categorías GO: función molecular y procesos biológicos. Se listan las primeras 10 vías enriquecidas para cada grupo de genes, con mayor expresión a 10 y 31 dpi. Se indican la cantidad de genes presentes en estos grupos que pertenecen a la vía, la cantidad de genes que presenta la vía general y el “*Fold Enrichment*”, que mide la magnitud del enriquecimiento con respecto al total de genes de la planta. Todas las vías son significativas con FDR menor a 0,05.

	Vía	Término GO	N° de genes	N° genes en la vía	<i>Fold Enrichment</i>
Inducidos a 10 dpi	Función molecular				
	Unión a iones metálicos	GO:0046872	67	2918	4,4
	Procesos biológicos				
	Proceso biosintético de trehalosa	GO:0005992	3	27	30,8
	Ciclo reductor de las pentosas fosfato	GO:0019253	2	20	27,7
	Respuesta al estrés	GO:0006950	2	21	26,4
	Fotorrespiración	GO:0009853	2	22	25,2
	Transcripción de ADN	GO:0006351	5	113	12,3
	Desfosforilación	GO:0016311	6	223	7,5
	Inducidos a 31 dpi	Función molecular			
Actividad alfa, alfa-trehalosa-fosfato sintasa (formadora de UDP)		GO:0003825	3	16	52,0
Actividad trehalosa fosfatasa		GO:0004805	3	20	41,6
Actividad de la ribulosa-bifosfato carboxilasa		GO:0016984	2	17	32,6
Actividad tiorredoxina-disulfuro reductasa		GO:0004791	3	34	24,5
Unión de ribonucleósidos		GO:0032549	3	34	24,5
Actividad ATPasa transportadora de hidrógeno - mecanismo fosforilante		GO:0008553	2	26	21,3
Actividad glutatión oxidoreductasa		GO:0097573	3	56	14,9
Actividad ARN polimerasa dirigida por ADN		GO:0003899	5	162	8,6
Unión a iones magnesio		GO:0000287	5	257	5,4
Unión a iones zinc		GO:0008270	12	1256	2,7
Unión a iones metálicos	GO:0046872	20	2918	1,9	

IV.3.1.C. Respuesta frente a nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno

Por otro lado, otro grupo de genes interesantes para su estudio son aquellos que se expresan en mayor medida en los nódulos ineficientes en la fijación de N. Estos genes presentan mayor expresión en nódulos infectados por LPU83 o Sma818B al compararlos con los nódulos de Sm2011 a 10 y 31 dpi ($\text{Log}_2\text{FoldChange}$ mayor a 1,5). A 10 dpi solamente se encuentran 14 genes diferenciales compartidos entre LPU83 y Sma818B. Al ser un grupo tan reducido de genes, no es posible realizar un enriquecimiento, por lo que se analizaron uno a uno los genes en cuanto a sus términos GO asignados. Si bien los 14 genes codifican para proteínas hipotéticas, la anotación sugiere que están involucrados en transporte celular y metabolismo. En cambio, a 31 dpi se encontraron 95 genes diferenciales compartidos entre las condiciones ineficientes en la fijación de N (marcado como E en la figura IV.3). Las tablas de genes completas se encuentran en el Anexo (Tablas A14-A15). Nuevamente se realizó un enriquecimiento de los términos GO. En la categoría de procesos biológicos, el único proceso enriquecido fue la vía del catabolismo de lignina, un componente de la pared celular. En *Medicago sativa*, se ha descrito que el catabolismo de esta macromolécula puede llevar a una activación de la respuesta de defensa de la planta (Gallego-Giraldo *et al.*, 2011, Man Ha *et al.*, 2019). Por otro lado, en la categoría función molecular se encontraron vías relacionadas a la síntesis de terpenos, metabolismo de lípidos y distintas actividades oxidorreductasas (Tabla IV.6).

Tabla IV.6. Vías enriquecidas en la respuesta de *M. truncatula* a nódulos ineficientes en la FBN a 31 dpi. Vías enriquecidas para dos categorías GO: función molecular y procesos biológicos. Se indican la cantidad de genes presentes en estos grupos que pertenecen a la vía, la cantidad de genes que presenta la vía general y el “*Fold Enrichment*”, que mide la magnitud del enriquecimiento con respecto al listado de genes. Todas las vías son significativas con FDR menor a 0,05.

Vía	Término GO	Nº de genes	Nº genes en la vía	Fold Enrichment
Procesos biológicos				
Proceso catabólico de lignina	GO:0046274	2	26	42,7
Funciones moleculares				
Actividad S-linalool sintasa	GO:0034007	3	15	111,0
Actividad hidroquinona:oxígeno oxidorreductasa	GO:0052716	2	33	33,6
Actividad 7,8-desaturasa del caroteno	GO:0016719	2	48	23,1
Actividad 9,9'-dícis-caroteno:quinona oxidorreductasa	GO:0052886	2	48	23,1
Actividad 7,9,9'-trícis-neurosporeno:quinona oxidorreductasa	GO:0052887	2	48	23,1
Actividad escopolina beta-glucosidasa	GO:0102483	2	62	17,9
Actividad terpeno sintasa	GO:0010333	3	98	17,0
Actividad beta-glucosidasa	GO:0008422	2	67	16,6
Actividad de la triglicérido lipasa	GO:0004806	3	143	11,6
Unión a ADP	GO:0043531	7	1070	3,6

IV.3.2. Diferencias entre nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de N

Mediante la comparación de los transcriptomas de los nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno se buscó encontrar genes o vías metabólicas que muestren una expresión diferencial en alguno de estos fenotipos, enfocándonos en determinantes que caracterizaran estos procesos.

Como se mencionó anteriormente, en la comparación entre nódulos infectados por LPU83 contra aquellos nódulos infectados por Sm2011 se encontraron 2946 y 1917 GEDs en nódulos a 10 dpi y 31 dpi, respectivamente. Las listas completas de genes se encuentran en el Anexo (Tablas A1 y A2). A 10 dpi, se identificaron 977 GEDs con mayor expresión en los nódulos de LPU83 (genes con mayor expresión en nódulos ineficientes) y 1969 genes presentan una mayor expresión en los nódulos de Sm2011 (genes con mayor expresión en nódulos eficientes). Llamativamente, hay un menor número de GEDs a los 31 dpi, siendo 742 más expresados en nódulos ineficientes y 1175 más expresados en nódulos eficientes. En ambos casos se mantiene la tendencia de un mayor número de genes con mayor expresión en los nódulos de *S. meliloti*. De acuerdo con estos resultados y observando que la respuesta entre los nódulos de LPU83 y Sma818B muestran respuestas similares debido a su agrupamiento en los *heatmap* y PCA de la Figura IV.2, se decidió continuar el estudio de nódulos eficientes e ineficientes enfocándonos en la comparación de plantas inoculadas con *S. meliloti* 2011 y con *R. favelukesii* LPU83, al ser ambas cepas de referencia aisladas de suelos y no construidas en el laboratorio como Sma818B.

IV.3.2.A. Análisis de enriquecimiento de genes en la comparación entre nódulos eficientes e ineficientes

En primer lugar, se realizaron análisis de enriquecimiento para los cuatro grupos de genes: más expresados en nódulos ineficientes y más expresados en nódulos eficientes a 10 y 31 dpi (Tabla IV.7 y Tabla IV.8). En los nódulos a 10 dpi, el análisis de enriquecimiento de genes con mayor expresión en nódulos de *S. meliloti* mostró que en la categoría de procesos biológicos, se encuentran enriquecidos los procesos de transporte de oxígeno y la biosíntesis de ADN. En la categoría de función molecular, se detectaron como enriquecidas las actividades de transporte y unión al oxígeno, actividad ADN polimerasa y unión a iones metálicos. La actividad relacionada al oxígeno está involucrada en la respuesta a leghemoglobinas, proteínas necesarias en los nódulos para transportar el O₂ de manera rápida, evitando la inactivación de la nitrogenasa bacteriana. Como ya se mencionó anteriormente, esta última categoría, asociada a unión a iones metálicos, incluye genes que codifican para NCRs, péptidos necesarios para la diferenciación de los bacteroides (Tabla IV.7). A 10 dpi, entre los procesos

biológicos enriquecidos en nódulos ineficientes se encuentran distintos procesos de biosíntesis (chalconas, policétidos y flavonoides), transducción de señales, proteólisis y el proceso de respuesta de defensa de la planta. Este último resultado era esperable debido a las características fenotípicas que presentan los nódulos de LPU83. En la categoría de función molecular, se encuentran enriquecidas distintas actividades de unión a ADP, ATP y unión a ADN, y enzimas con distintas actividades (Tabla IV.7). De esta manera, se observa que en los nódulos ocupados por LPU83 a 10 dpi hay una respuesta de defensa por parte de la planta, acompañado con proteólisis y el aumento de moléculas con unión a distintos ligandos. Como ya se mencionó, las chalconas son precursores de los flavonoides por lo que la biosíntesis de estos últimos estaría inducida. La respuesta de la planta a la infección por parte de *S. meliloti*, en cambio, se centra en el metabolismo del oxígeno, el cual debe estar presente en baja concentración dentro de los nódulos para permitir la fijación de nitrógeno (Fischer, 1994, Ott *et al.*, 2005) y la síntesis de NCRs, promoviendo la diferenciación bacteriana (Pan & Wang, 2017).

Tabla IV.7. Vías enriquecidas en la comparación de nódulos de *M. truncatula* eficientes contra ineficientes a 10 dpi. Vías enriquecidas para dos categorías GO: función molecular y procesos biológicos. Se indican la cantidad de genes presentes en estos grupos que pertenecen a la vía, la cantidad de genes que presenta la vía general y el “*Fold Enrichment*”, que mide la magnitud del enriquecimiento con respecto al listado de genes. Todas las vías son significativas con FDR menor a 0,05.

Nódulos 10 dpi	Vía	Termino GO	N° de genes	N° genes de la vía	<i>Fold Enrichment</i>
Mayor expresión en nódulos eficientes (Sm2011)	Procesos biológicos				
	Transporte de oxígeno	GO:0015671	10	19	14,1
	Proceso de biosíntesis de ADN dependiente de ARN	GO:0006278	26	318	2,2
	Función molecular				
	Actividad de transporte de oxígeno	GO:0005344	10	19	14,1
	Unión a oxígeno	GO:0019825	10	20	13,4
	Unión a iones metálicos	GO:0046872	396	2918	3,6
	Actividad ADN polimerasa dependiente de ARN	GO:0003964	26	315	2,2
Mayor expresión en nódulos ineficientes (LPU83)	Procesos biológicos				
	Proceso biosintético de chalconas	GO:0009715	6	11	29,4
	Regulación del proceso biosintético de ácido salicílico	GO:0080142	6	15	21,6
	Proceso biosintético de los policétidos	GO:0030639	10	30	18,0
	Proceso catabólico de L-fenilalanina	GO:0006559	4	13	16,6
	Proceso biosintético de flavonoides	GO:0009813	12	49	13,2
	Respuesta de defensa contra otro organismo	GO:0098542	9	70	6,9
	Proteólisis involucrada en proceso de catabólico de proteínas celulares	GO:0051603	9	73	6,7
	Autofosforilación de proteínas	GO:0046777	31	331	5,1
Respuesta de defensa	GO:0006952	43	805	2,9	

Nódulos 10 dpi	Vía	Termino GO	N° de genes	N° genes de la vía	Fold Enrichment
Mayor expresión en nódulos ineficientes (LPU83)	Transducción de señales	GO:0007165	25	558	2,4
	Función molecular				
	Actividad de la naringenina-chalcona sintasa	GO:0016210	10	34	15,9
	Actividad quitinasa	GO:0004568	10	67	8,1
	Unión a ion manganeso	GO:0030145	9	83	5,9
	Actividad carboxipeptidasa tipo serina	GO:0004185	10	100	5,4
	Unión a polisacáridos	GO:0030247	14	179	4,2
	Actividad glicerofosfodiéster fosfodiesterasa	GO:0008889	10	141	3,8
	Unión a secuencias específicas de ADN	GO:0043565	19	382	2,7
	Actividad de la proteína serina/treonina quinasa	GO:0004674	35	830	2,3
	Unión a ADP	GO:0043531	38	1070	1,9
Unión a ATP	GO:0005524	111	4107	1,5	

En nódulos más desarrollados, de 31 dpi, se detectaron enriquecidos entre los genes más expresados en nódulos ineficientes los procesos biológicos de transporte transmembrana y de aminoácidos y, nuevamente, respuesta de defensa contra bacterias. Con respecto a las funciones moleculares enriquecidas, se detectaron aquellas de unión a hierro, grupo hemo, carbohidratos y polisacáridos, actividad S-linalool sintasa, terpeno sintasa y serina/treonina quinasa (Tabla IV.8). En cambio, al analizar los genes más expresados en nódulos eficientes, se encontraron procesos biológicos enriquecidos relacionados con la fotosíntesis y regulación del ciclo circadiano, procesos relacionados al hierro y, nuevamente, transporte de oxígeno. En cuanto a las funciones moleculares enriquecidas se detectaron actividades relacionadas al oxígeno y la unión a iones metálicos como se mencionó para 10 dpi. La función con mayor tasa de enriquecimiento encontrada fue la actividad ribulosa bifosfato carboxilasa con 8 de 17 genes necesarios presentes entre los GEDs. Nuevamente, se observa que la respuesta de la planta a la infección por parte de *S. meliloti* lleva a una activación del transporte y metabolismo de oxígeno y de los genes correspondientes a los NCRs. Sin embargo, se observa que a 31 dpi esta respuesta es menor que a 10 dpi, con tasas de enriquecimiento menores. Esto podría explicarse debido a que el proceso de diferenciación se encuentra avanzado y la fijación de N funcionando, por ende, no se requeriría una expresión tan elevada de los NCRs y de los genes necesarios para el establecimiento de la simbiosis.

Tabla IV.8. Vías enriquecidas en la comparación de nódulos de *M. truncatula* eficientes contra ineficientes a 31 dpi. Vías enriquecidas para dos categorías GO: función molecular y procesos biológicos. Se indican la cantidad de genes presentes en estos grupos que pertenecen a la vía, la cantidad de genes que presenta la vía general y el “*Fold Enrichment*”, que mide la magnitud del enriquecimiento con respecto al listado de genes. Todas las vías son significativas con FDR menor a 0,05.

	Vía	Termino GO	Nº de genes	Nº genes de la vía	<i>Fold Enrichment</i>
Mayor expresión en nódulos eficientes (Sm2011)	Procesos biológicos				
	Ciclo reductor de las pentosas fosfato	GO:0019253	7	20	15,7
	Fotorrespiración	GO:0009853	7	22	14,3
	Regulación del ritmo circadiano	GO:0042752	4	14	12,8
	Proceso biosintético de trehalosa	GO:0005992	6	27	10,0
	Transporte transmembrana de iones de hierro	GO:0034755	4	18	10,0
	Transporte de oxígeno	GO:0015671	4	19	9,4
	Secuestro intracelular de iones de hierro	GO:0006880	4	19	9,4
	Proceso metabólico de la glutamina	GO:0006541	6	43	6,3
	Fotosíntesis	GO:0015979	15	140	4,8
	Desfosforilación	GO:0016311	14	223	2,8
	Función molecular				
	Actividad de la ribolsa-bifosfato carboxilasa	GO:0016984	8	17	21,1
	Actividad beta-amilasa	GO:0016161	4	11	16,3
	Actividad trehalosa-fosfatasa	GO:0004805	6	20	13,5
	Actividad alfa, alfa-trehalosafosfato sintasa (formadora de UDP)	GO:0003825	4	16	11,2
	Actividad transportadora de oxígeno	GO:0005344	4	19	9,4
	Actividad de transporte transmembrana de iones de hierro	GO:0005381	4	19	9,4
	Unión al oxígeno	GO:0019825	4	20	9,0
	Actividad tiorredoxina-disulfuro reductasa	GO:0004791	5	34	6,6
Actividad monooxigenasa	GO:0004497	19	280	3,0	
Unión de iones metálicos	GO:0046872	97	2918	1,5	
Mayor expresión en nódulos ineficientes (LPU83)	Procesos biológicos				
	Regulación del proceso de desarrollo	GO:0050793	3	11	19,4
	Proceso biosintético de compuestos aromáticos	GO:0019438	9	58	11,0
	Biogénesis de la pared celular secundaria de tipo vegetal	GO:0009834	6	41	10,4
	Vía de señalización de la proteína receptora transmembrana serina/treonina quinasa	GO:0007178	7	71	7,0
	Respuesta de defensa frente a oomicetos	GO:0002229	7	72	6,9
	Transporte de aminoácidos	GO:0006865	8	104	5,5
	Respuesta de defensa frente a bacterias	GO:0042742	10	152	4,7
	Reconocimiento del polen	GO:0048544	10	187	3,8
	Fosforilación de proteínas	GO:0006468	57	1815	2,2
	Transporte transmembrana	GO:0055085	33	1061	2,2
	Función molecular				
	Actividad de la S-linalool sintasa	GO:0034007	9	15	42,6
	Actividad jasmonato O-metiltransferasa	GO:0030795	5	20	17,8
	Actividad terpeno sintasa	GO:0010333	13	98	9,4

	Vía	Termino GO	N° de genes	N° genes de la vía	Fold Enrichment
Mayor expresión en nódulos ineficientes (LPU83)	Unión de polisacáridos	GO:0030247	13	179	5,2
	Actividad oxidorreductasa-actuando sobre donantes emparejados con incorporación o reducción de moléculas	GO:0016705	18	260	4,9
	Actividad monooxigenasa	GO:0004497	18	280	4,6
	Unión de iones de hierro	GO:0005506	36	682	3,8
	unión de hemo	GO:0020037	42	798	3,7
	Unión de carbohidratos	GO:0030246	21	416	3,6
	Actividad de la proteína serina/treonina quinasa	GO:0004674	36	830	3,1

IV.3.2.B. Genes simbióticos necesarios en *M. truncatula*

Como se mencionó en la introducción, el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa tiene décadas en progreso (Roy *et al.*, 2020). En particular, *M. truncatula* es una de las leguminosas más estudiadas por lo que el conocimiento sobre las distintas etapas de la simbiosis y los genes necesarios para cada una de ellas es amplio.

Con el fin de identificar una posible etapa en donde la simbiosis esté fallando en los nódulos ineficientes, se decidió analizar en detalle la expresión de los genes estudiados previamente en *M. truncatula* descritos como esenciales para la simbiosis en esta planta. En la figura I.7 se muestra la lista de genes identificados como esenciales recientemente recopilados (Roy *et al.*, 2020). En la tabla IV.9 se muestran los genes descritos como esenciales (Figura I.7) que presentan expresión diferencial entre LPU83 y Sm2011 a 10 dpi. De los 199 genes esenciales, únicamente 12 presentan expresión diferencial al comparar nódulos de LPU83 contra Sm2011, donde 6 tienen mayor expresión en nódulos eficientes y 6 mayor expresión en nódulos ineficientes. Como se observa en la tabla IV.9, los genes comienzan a tener una mayor expresión en los nódulos eficientes a partir de la etapa de maduración de los bacteroides y del establecimiento del metabolismo y transporte dentro de los nódulos. El gen *MtDNF7*, que codifica para el NCR169, se expresa en mayor medida en los nódulos eficientes en la FBN, lo cual puede sugerir que parte del fenotipo ineficiente esté relacionado a una expresión alterada de los NCRs. Por otro lado, otro gen con una mayor expresión en nódulos eficientes es *MtMOT1.3*, que codifica para un transportador de molibdeno que se expresa únicamente en los nódulos y es un cofactor necesario para la actividad de la nitrogenasa (Tejada-Jimenez *et al.*, 2017). En cambio, el gen *MtCP6*, que codifica para una cisteína proteasa, se expresa más en nódulos ineficientes. Se ha demostrado que su expresión temprana induce senescencia (Pierre *et al.*, 2014), por lo que sus altos niveles de expresión sugerirían un proceso de senescencia activado en este tipo de nódulos pese a ser un tiempo temprano en la simbiosis.

Tabla IV.9. Genes simbióticos con expresión diferencial entre nódulos eficientes e ineficientes a 10 dpi. Se indican los nombres de los genes en *M. truncatula* o los ortólogos en *Lotus japonicus* o *Glycine max*, la etapa del desarrollo de la simbiosis en el que se involucra y el *locus tag* del gen en *M. truncatula* V5.0 r1.8. El ID corresponde al número asignado en la figura I.7. Por último, se indica el *Log₂FoldChange* (LFC) de la comparación entre nódulos de LPU83 contra nódulos de Sm2011. Si LFC es positivo, indica mayor expresión en nódulos de LPU83 (ineficientes), en caso de ser negativo indica mayor expresión en nódulos de Sm2011 (eficientes). De los genes presentes en la figura I.7, se indican sólo aquellos genes con *adjusted p-value* menor a 0,05.

Nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011 a 10 dpi				
Etapa de la simbiosis	ID	Gen/ortólogo	Locus tag	LFC
Señalización temprana	6	<i>MtCHR</i>	MtrunA17_Chr5g0447951	1,4
Señalización temprana	19	<i>MtFNSII</i>	MtrunA17_Chr7g0224551	1,4
Señalización temprana	21	<i>GmIFS1/GmIFS2</i>	MtrunA17_Chr4g0046321	1,3
Infección bacteriana	50	<i>MtFLOT4</i>	MtrunA17_Chr3g0137271	1,9
Maduración de los bacteroides	149	<i>MtDNF7</i>	MtrunA17_Chr7g0229931	-4,2
Maduración de los bacteroides	153	<i>LjSEN1</i>	MtrunA17_Chr4g0050851	-2,7
Metabolismo y transporte en el nódulo	166	<i>MtCOPT1</i>	MtrunA17_Chr4g0008841	-2,4
Metabolismo y transporte en el nódulo	169	<i>MtMOT1.3</i>	MtrunA17_Chr3g0105081	-7,5
Metabolismo y transporte en el nódulo	173	<i>LjNPF8.6</i>	MtrunA17_Chr3g0104011	1,8
Metabolismo y transporte en el nódulo	176	<i>GmPT5</i>	MtrunA17_Chr7g0261231	-2,3
Metabolismo y transporte en el nódulo	178	<i>LjSST1</i>	MtrunA17_Chr6g0485191	-2,5
Senescencia	185	<i>MtCP6</i>	MtrunA17_Chr4g0041081	5,4

En la comparación de nódulos de LPU83 contra aquellos generados por Sm2011 a 31 dpi, se detectan nuevamente pocos genes diferencialmente expresados de aquellos identificados como esenciales, siendo estos 13 en total. Un total de 7 genes presentan mayor expresión en los nódulos ineficientes de LPU83, presentes en mayor medida en la etapa de señalización temprana en la simbiosis (Tabla IV.10). El gen *MtCHS*, que codifica para una chalcona sintasa, se encuentra inducido en estos nódulos ineficientes, sugiriendo nuevamente que la síntesis de flavonoides se mantiene inducida a 31 dpi (Zhang *et al.*, 2009). A medida que avanza la organogénesis del nódulo, los genes comienzan a tener una mayor expresión en los nódulos eficientes de Sm2011, siendo 6 diferencialmente expresados en total. El gen *MtTML2*, que codifica para una proteína involucrada en la regulación negativa del número de nódulos (Gautrat *et al.*, 2019), se expresa en mayor medida en los nódulos de Sm2011 que en los de LPU83, relacionándose con el hecho de que LPU83 genera un mayor número de nódulos. Por otro lado, el gen *MtSUCS1* se encuentra expresado en mayor medida en los nódulos eficientes, con un LFC de -2,1. Este gen codifica para una sacarosa sintasa, necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (Baier *et al.*, 2007).

Tabla IV.10. Genes simbióticos con expresión diferencial entre nódulos eficientes e ineficientes a 31 dpi. Se indican los nombres de los genes en *M. truncatula* o los ortólogos en *Lotus japonicus* o *Glycine max*, la etapa del desarrollo de la simbiosis en el que se involucra y el *locus tag* del gen en *M. truncatula* V5.0 r1.8. El ID corresponde al número asignado en la figura I.7. Por último, se indica el *Log₂FoldChange* (LFC) de la comparación entre nódulos de LPU83 contra nódulos de Sm2011. Si LFC es positivo, indica mayor expresión en nódulos de LPU83 (ineficientes), en caso de ser negativo indica mayor expresión en nódulos de Sm2011 (eficientes). De los genes presentes en la figura I.7, se indican sólo aquellos genes con *adjusted p-value* menor a 0,05.

Nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011 a 31 dpi				
Etapa de la simbiosis	ID	Gen/ortólogo	Locus tag	LFC
Señalización temprana	7	<i>MtCHS</i>	MtrunA17_Chr7g0252331	2,9
Señalización temprana	18	<i>LjEPR3</i>	MtrunA17_Chr5g0413071	1,5
Señalización temprana	19	<i>MtFNSII</i>	MtrunA17_Chr7g0224551	1,4
Señalización temprana	21	<i>GmIFS1/GmIFS2</i>	MtrunA17_Chr4g0046321	1,2
Señalización temprana	22	<i>LjLNP</i>	MtrunA17_Chr7g0252891	1,5
Organogénesis del nódulo	92	<i>LjENOD40-1/ENOD40-2</i>	MtrunA17_Chr8g0368441	-2,4
Organogénesis del nódulo	95	<i>MtERN2</i>	MtrunA17_Chr6g0461271	1,3
Organogénesis del nódulo	96	<i>GmEXPB2</i>	MtrunA17_Chr7g0231221	3,0
Organogénesis del nódulo	103	<i>GmINS1</i>	MtrunA17_Chr1g0161531	-1,4
Autorregulación del número de nódulos	145	<i>MtTML2</i>	MtrunA17_Chr6g0459491	-1,6
Metabolismo y transporte en el nódulo	179	<i>MtSUCS1</i>	MtrunA17_Chr4g0070011	-2,1
Metabolismo y transporte en el nódulo	180	<i>LjSUS1/LjSUS3</i>	MtrunA17_Chr4g0070011	-2,1
Senescencia	187	<i>MtFER2</i>	MtrunA17_Chr5g0437531	-1,8

Como se mencionó en la introducción (ver sección I.3.3), el factor de transcripción NIN y los factores nucleares NF-YC1 y NF-YA1 son cruciales para el desarrollo de una simbiosis. No se detectan diferencias en la expresión genética del factor de transcripción NIN, ni de NF-YC1 y NF-YA1 al comparar nódulos de LPU83 contra Sm2011, sugiriendo que la expresión de estos factores no se encuentra alterada en los nódulos ineficientes. Sin embargo, se encuentran diferencias a 10 dpi en los niveles de expresión del factor de transcripción *MtNLP2* (*M. truncatula NIN-like protein 2*), el cual se expresa en mayor medida en los nódulos eficientes. *MtNLP2* juega un papel clave en nódulos maduros induciendo la expresión de leghemoglobinas (Jiang *et al.*, 2021).

Estos resultados muestran que los nódulos ineficientes generados por LPU83 parecen tener una falla en la maduración de los bacteroides y en el metabolismo dentro del nódulo. La señalización temprana, relacionada principalmente a la síntesis de flavonoides, se encuentra inducida en los nódulos ineficientes aún a 31 dpi, lo que implica un constante intento de desarrollar nódulos nuevos (y eficientes). De esto modo, y como era de esperarse, no se identifica un único gen como responsable de los fallos en esta simbiosis. Por el contrario, varias vías parecen estar alteradas durante el desarrollo de esta simbiosis ineficiente.

IV.3.2.C. Genes asociados a senescencia

En trabajos recientes se ha buscado conocer en mayor medida los mecanismos que controlan la senescencia de los nódulos. Sauviac *et al.* (2022) realizaron estudios de transcriptómica dual con nódulos de *M. truncatula* naturalmente senescentes por su envejecimiento y con nódulos a los cuales se les indujo la senescencia mediante factores abióticos. Considerando que en los nódulos infectados por LPU83 se encuentran enriquecidos genes involucrados en el proceso de defensa de la planta, y que además se detectó una proteasa específica de senescencia diferencialmente expresada (*MtCP6*, tabla IV.9), se analizó si una posible respuesta a la infección ineficiente sea la senescencia temprana de los nódulos. Para llevar a cabo esto, se utilizó la denominada lista de genes *core* (centrales) asociados a senescencia, que contiene 201 genes que se encuentran sobreexpresados en todas las condiciones de inducción de senescencia estudiadas previamente (Sauviac *et al.*, 2022). Dentro de este grupo se encuentran genes que codifican para proteínas con distintas funciones como proteasas, reguladores transcripcionales y proteínas involucradas en transporte.

En la tabla IV.11 se indica la cantidad de GEDs entre nódulos eficientes e ineficientes que forman parte de los genes centrales para la comparación entre nódulos eficientes e ineficientes. La lista de genes junto con la expresión en cada comparación se encuentra en el Anexo (Tabla A16). Llamativamente, a 10 dpi todos los genes diferenciales encontrados se expresan en mayor medida en los nódulos de LPU83, esto daría a entender que el nódulo tendría una senescencia temprana. Dentro de este grupo se detectan cuatro cisteín-proteasas: *MtCP5*, *MtCP7*, *MtCP8* y *MtCP9*. Por otro lado, también se encuentra el gen *MtTAX3* inducido en este tipo de nódulo ineficiente, involucrado en la secreción de péptidos pequeños. A 31 dpi, aumenta la proporción de genes sobreexpresados en los nódulos de Sm2011. En particular, un regulador transcripcional involucrado en la senescencia del nódulo (*MtNF-YB17*) se expresa en mayor medida en este tipo de nódulos, indicando la senescencia normal de los mismos.

Tabla IV.11. Genes expresados diferencialmente presentes en el grupo de genes centrales asociados a senescencia. Número de GEDs para la comparación de nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011 a los distintos tiempos utilizados presentes dentro del grupo de los 201 genes *core*.

Nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011		
Tiempo	Tipo de expresión	GED
10 dpi	Mayor expresión en nódulos Sm2011	-
	Mayor expresión en nódulos LPU83	46
31 dpi	Mayor expresión en nódulos Sm2011	13
	Mayor expresión en nódulos LPU83	15

IV.4. Estudio de los transcriptomas bacterianos en vida libre y dentro de nódulos de *M. truncatula*

Como se mostró en la figura IV.1, además de las muestras correspondientes a los nódulos de *M. truncatula*, se cultivaron las bacterias en vida libre y se les realizó una extracción de ARN. Mediante la construcción de las bibliotecas y posterior secuenciación se obtuvo un número de entre 14 y 19 millones de lecturas mapeadas a los genomas bacterianos (Tabla IV.1). Los distintos análisis que se muestran a continuación corresponden a la comparación de los transcriptomas dentro y fuera de los nódulos para cada bacteria utilizada. Se indica la condición de las bacterias dentro del nódulo como “bacteroides” independientemente de su estado de diferenciación.

IV.4.1. Transcriptoma de *R. favelukesii* LPU83

El genoma de LPU83 contiene 7700 genes anotados (Wibberg *et al.*, 2014), de los cuales 7697 fueron mapeados a las lecturas obtenidas. Luego del análisis de expresión diferencial mediante DESeq2, se obtuvieron 3296 y 2516 GEDs al comparar los bacteroides a 10 dpi o 31 dpi contra las bacterias en vida libre, respectivamente. Al comparar los bacteroides a 31 dpi contra 10 dpi, se identificaron 1358 GEDs (Tabla IV.12). Las tablas de genes diferenciales de LPU83 se encuentran en el Anexo (Tablas A17-A19). Las comparaciones realizadas muestran el gran cambio en la transcripción de genes que sufren los bacteroides dentro del nódulo, modificando la expresión de gran parte de su genoma.

Tabla IV.12. Genes expresados diferencialmente en las muestras correspondientes a LPU83. Los GEDs son aquellos con *adjusted p-value* menor a 0.05 y *Log₂FoldChange* mayor a 1,5 (mayor expresión en la primera condición) o menor a -1,5 (mayor expresión en la segunda condición).

Comparaciones	Mayor expresión en Vida libre	Mayor expresión en Bacteroides a 10 dpi	Mayor expresión en Bacteroides a 31 dpi	GEDs totales
Bacteroides 10 dpi contra vida libre	1288	1809	-	3296
Bacteroides 31 dpi contra vida libre	1065	-	1451	2516
Bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi	-	657	701	1358

En primer lugar, se decidió evaluar la distribución de los GEDs en los distintos replicones de LPU83. Como ya fue mencionado, LPU83 posee, además de su cromosoma, cuatro plásmidos con distintos tamaños (Torres Tejerizo *et al.*, 2010, Wibberg *et al.*, 2014). Del total de GEDs obtenidos, el mayor porcentaje corresponde a genes del cromosoma de la bacteria, siendo aproximadamente el 50% de los genes

para las comparaciones realizadas. Para evaluar cómo cambia la expresión de los genes en cada replicón individualmente, se calculó el porcentaje de GEDs de cada replicón con respecto a la cantidad de genes contenidos en cada uno. Como se observa en la figura IV.4, el mayor porcentaje de GEDs se encuentra en el plásmido simbiótico, pLPU83b, donde aproximadamente el 60% de sus genes aumentan su expresión en los bacteroides, tanto a 10 como a 31 dpi. Alrededor del 20% de los genes presentes en el cromosoma tienen mayor expresión en vida libre, tanto al comparar contra bacteroides a 10 como a 31 dpi (Figura IV.4).

Por otro lado, también se agrupó a los GEDs de acuerdo con su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COGs, *Cluster of orthologous groups*) (Tatusov *et al.*, 1997, Galperin *et al.*, 2021). Esta base de datos le asigna una categoría funcional (indicada con una letra) a cada proteína según su función; estas categorías se agrupan en 4 categorías generales: almacenamiento y procesamiento de información (J, A, K, L, B), procesos celulares y señalización (D, Y, V, T, M, N, Z, W, U, O), metabolismo (C, G, E, F, H, I, P, Q) y proteínas aún no caracterizadas (R, S). Entre los genes con mayor expresión en los bacteroides tanto a 10 como a 31 dpi, el mayor porcentaje de genes corresponde a la categoría de proteínas con función desconocida, seguido por genes involucrados en el metabolismo (Figura IV.5). A su vez, para los genes cuya expresión disminuye dentro de los nódulos (mayor expresión en las bacterias en vida libre), la categoría más representada fue la de metabolismo, seguido por procesos celulares y señalización (Figura IV.5). Estas distribuciones muestran los grandes cambios metabólicos que sufren las bacterias dentro de los nódulos y la presencia de una gran cantidad de genes sin función asignada que se encuentran involucrados en el proceso de diferenciación.

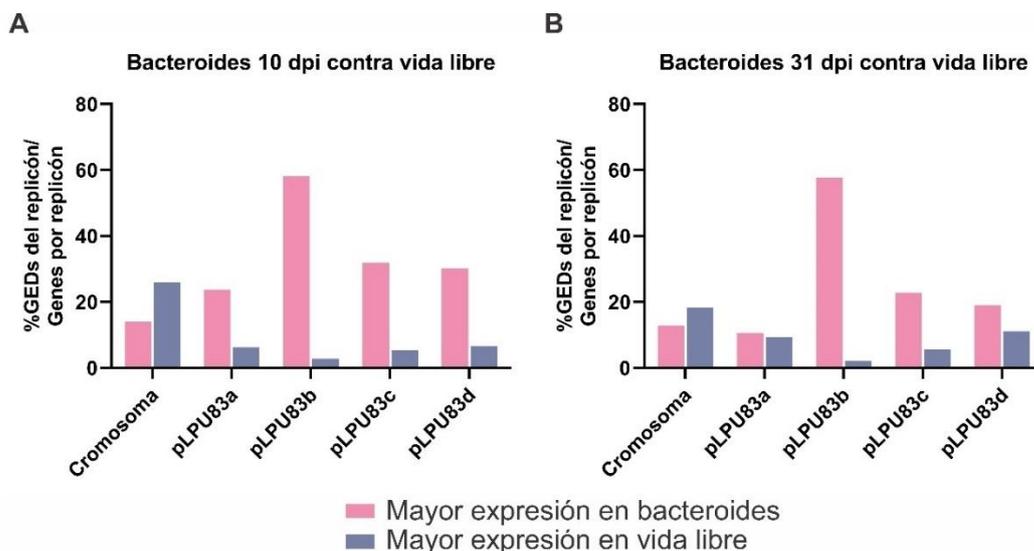


Figura IV.4. Distribución de GEDs en los replicones de LPU83. A. Comparación de bacteroides a 10 dpi contra bacterias en vida libre. **B.** Comparación de bacteroides a 31 dpi contra bacterias en vida libre. Mayor expresión en bacteroides corresponde a 10 o 31 dpi según la comparación.

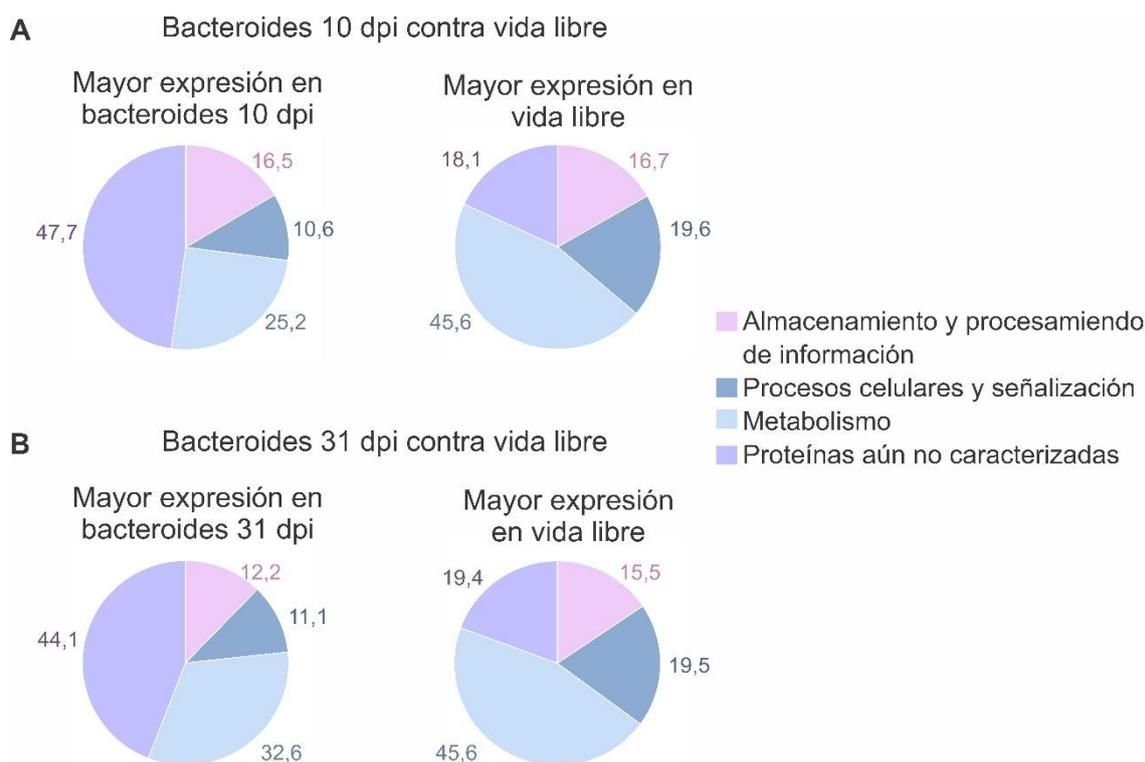


Figura IV.5. Distribución de GEDs de LPU83 en las cuatro categorías generales de COGs. Se indica el porcentaje de los GEDs correspondientes a cada categoría para las dos comparaciones **A**. Bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre y **B**. Bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre.

Dentro de los genes con mayor expresión en bacteroides a 10 dpi y 31 dpi, en el grupo de almacenamiento y procesamiento de la información, las categorías más representadas fueron las de replicación, recombinación y reparación del ADN (L) y transcripción (K) (Figura IV.6). Mientras que, en el grupo de procesos celulares y señalización, las categorías con mayor representación fueron biogénesis de membrana/pared celular (M) y mecanismos de transducción de señales (T). Por último, en el grupo de metabolismo hay una representación variada en todas las categorías, siendo las principales transporte y metabolismo de aminoácidos y carbohidratos (E y G) y, producción y conversión de energía (C). En cuanto a las categorías representadas en los genes con mayor expresión en las bacterias en vida libre, se encuentra traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J) y transcripción (K) para el grupo de almacenamiento y procesamiento de la información. Dentro de procesos celulares y señalización, los más representados fueron biogénesis de membrana/pared celular (M) y mecanismos de transducción de señales (T). El grupo de metabolismo mostró valores variados para todas las categorías: presentó una mayor representación en transporte y metabolismo de aminoácidos y carbono (E y G) seguido de producción y conversión de energía (C) para la comparación con los bacteroides a 10 dpi (Figura IV.6.A) y, transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P) para la comparación contra bacteroides 31 dpi (Figura IV.6.B).

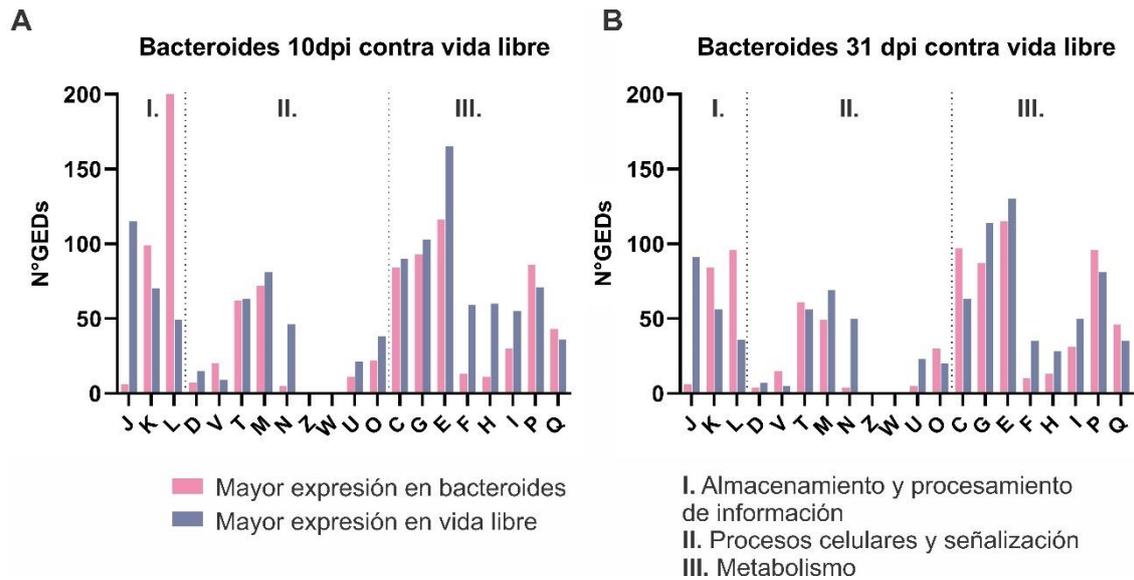


Figura IV.6. Representación de COGs entre los genes diferencialmente expresados de LPU83.

A. Comparación entre bacteroides 10 dpi y bacterias en vida libre. **B.** Comparación entre bacteroides 31 dpi y bacterias en vida libre. Se indican como sobreexpresados dentro de los nódulos aquellos con $\log_2\text{FoldChange}$ mayor a 1,5 y como disminuidos en los nódulos aquellos genes con $\log_2\text{FoldChange}$ menor a -1,5. Las letras en las figuras corresponden a las categorías funcionales de la siguiente manera: J: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis; K: Transcripción; L: replicación, recombinación y reparación del ADN; D: Control del ciclo celular, división celular y división del cromosoma; V: Mecanismos de defensa; T: Mecanismos de transducción de señales; M: Biogénesis de membrana/pared celular; N: Movilidad celular; Z: Citoesqueleto; W: Estructuras extracelulares; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas; O: Modificaciones postraduccionales, renovación de proteínas y chaperonas; C: Producción y conversión de energía; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios.

Otra comparación que se realizó es entre los bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi. De esta manera, se analizaron los cambios transcripcionales que ocurren en el bacteroide durante el desarrollo del nódulo, desde tiempos cortos con nódulos pequeños (10 dpi) a aquellos ya desarrollados (31 dpi). Como se muestra en la tabla IV.12, al realizar el análisis de expresión diferencial se encuentran alrededor de 1400 GEDs, con la mitad teniendo mayor expresión a los 31 dpi y la otra mitad, mayor expresión a los 10 dpi. En cuanto a la distribución de los GEDs en cada replicación de LPU83, el 20% de los genes de pLPU83b aumentan su expresión a 31 dpi en comparación con 10 dpi (Figura IV.7.A). Por otro lado, alrededor de un 20% de los genes de pLPU83a tiene mayor expresión en los nódulos de LPU83 a los 10 dpi (Figura IV.7.A). Los GEDs fueron clasificados según los grupos ortólogos y se observó que, para los genes con mayor expresión en los bacteroides 31 dpi, el mayor porcentaje de GEDs pertenece al grupo de metabolismo, seguido por el grupo de proteínas no caracterizadas (Figura IV.7.C). Esta observación fue la inversa para los genes con mayor expresión en bacteroides 10

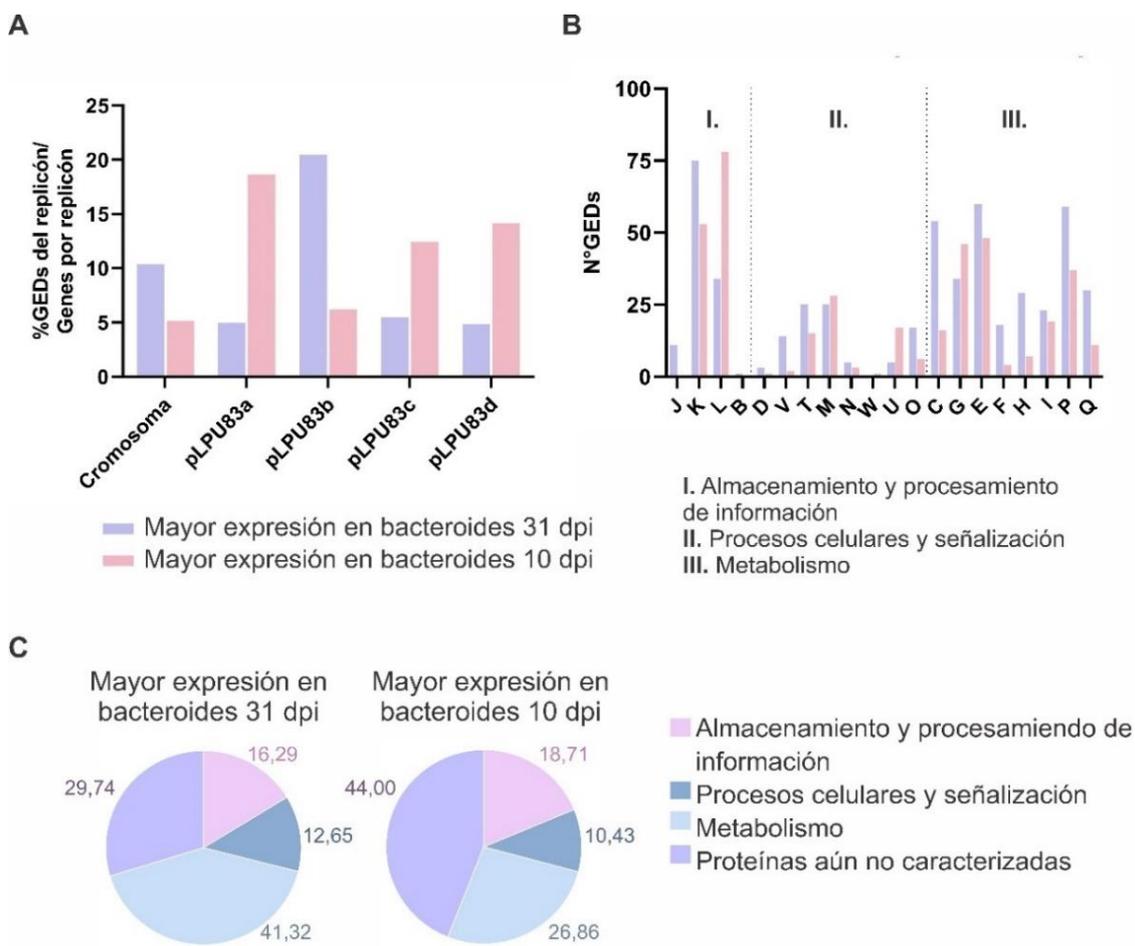


Figura IV.7. Comparación entre transcriptomas de bacteroides de LPU83 a 31 dpi contra bacteroides a 10 dpi. A. Distribución de GEDs entre los genes totales de cada replicón de LPU83 para esta comparación. **B.** Porcentaje de GEDs pertenecientes a cada categoría de COGs. Las letras en las figuras corresponden a las categorías funcionales de la siguiente manera: J: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis; K: Transcripción; L: replicación, recombinación y reparación del ADN; B: Dinámica y estructura de la cromatina; D: Control del ciclo celular, división celular y división del cromosoma; V: Mecanismos de defensa; T: Mecanismos de transducción de señales; M: Biogénesis de membrana/pared celular; N: Movilidad celular; W: Estructuras extracelulares; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas; O: Modificaciones postraduccionales, renovación de proteínas y chaperonas; C: Producción y conversión de energía; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios. **C.** Distribución de GEDs entre las categorías generales de COGs.

dpi: la mayor cantidad de genes pertenecían al grupo de proteínas no caracterizadas y luego al grupo metabolismo (Figura IV.7.C). Para los genes con mayor expresión en bacteroides de 31 dpi, las categorías más representadas fueron transcripción (K), producción y conversión de energía (C), transporte y metabolismo de aminoácidos e iones inorgánicos (E y P) (Figura IV.7.B). Por otro lado, para los genes con mayor expresión en bacteroides 10 dpi, encontramos las categorías replicación, recombinación y reparación (L), transcripción (K), transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (G y E) (Figura IV.7.B). Estos resultados indicarían una mayor cantidad de

genes involucrados en el metabolismo del ADN en los bacteroides 10 dpi, lo que puede relacionarse con el hecho de que los bacteroides deban endorreduplicar su ADN como parte de su proceso de diferenciación o duplicación dentro del nódulo. Como se ha mencionado en la introducción (sección I.3.5), la endorreduplicación del ADN y la división celular son claves en la diferenciación de la bacteria en bacteroides. Los genes específicos de este proceso serán estudiados puntualmente en el capítulo V.

IV.4.2. Transcriptoma de *S. meliloti* 2011

Del total de 8257 elementos anotados en el genoma de Sm2011, que incluye genes que codifican proteínas, ARN no codificantes y elementos móviles, 8242 fueron detectados tras la secuenciación por Illumina. Mediante el análisis de expresión diferencial realizado por DESeq2, se encontraron miles de genes diferencialmente expresados. Fueron excluidos de este análisis los elementos clasificados como ncRNA, por lo que de ahora en adelante los GEDs son aquellos que codifican para proteínas. Al comparar los transcriptomas de los bacteroides de Sm2011 a 10 y 31 dpi contra las bacterias en vida libre se obtuvieron 2475 y 3265 GEDs, respectivamente. En la tabla IV.13 se indica la cantidad de genes con mayor expresión en cada condición para cada comparación. La lista completa de genes diferenciales para Sm2011 se encuentra en el Anexo (Tablas A20-A22). Al comparar la expresión de genes entre los bacteroides de Sm2011 a 10 dpi contra aquellos a 31 dpi, se obtuvieron 1000 genes (Tabla IV.13).

Tabla IV.13. Genes diferencialmente expresados en las muestras correspondientes a Sm2011.

Los genes diferenciales son aquellos con *adjusted p-value* menor a 0,05 y *Log₂FoldChange* mayor a 1,5 (mayor expresión en la primera condición) o menor a -1,5 (mayor expresión en la segunda condición).

Comparaciones	Mayor expresión en Vida libre	Mayor expresión en Bacteroides a 10 dpi	Mayor expresión en Bacteroides a 31 dpi	GEDs totales
Bacteroides 10 dpi contra vida libre	1409	1066	-	2475
Bacteroides 31 dpi contra vida libre	1844	-	1421	3265
Bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi	-	417	583	1000

Respecto a la distribución de los GEDs en los replicones de Sm2011 la distribución es similar en las dos comparaciones realizadas: el 40% de los genes del pSymA se expresan en mayor medida en los bacteroides con respecto a las bacterias en vida libre (Figura IV.8), lo cual era un resultado esperado al ser este el plásmido simbiótico de la cepa y también, de acuerdo a resultados previos de otros trabajos publicados (Capela *et al.*, 2006, Roux *et al.*, 2014). Por otro lado, entre el 30-40% de los genes presentes

en el cromosoma disminuyen su expresión dentro de los nódulos (mayor expresión en vida libre) (Figura IV.8). En cuanto al plásmido pSymB, el porcentaje de GEDs por genes del replicón es similar tanto para los genes que aumentan su expresión en los bacteroides, como para aquellos que tienen mayor expresión en las bacterias en vida libre (Figura IV.8).

La distribución de los GEDs dentro de los COGs mostró que la categoría de proteínas con función desconocida fue la más representada entre los genes con mayor expresión en los bacteroides de Sm2011, representando el 40% de los GEDs a 10 y 31 dpi, seguido por la categoría de metabolismo (Figura IV.9). Para los genes con mayor expresión en las bacterias en vida libre, la categoría más representada es metabolismo con aproximadamente el 50% de los GEDs, seguida por proteínas con función desconocida (Figura IV.9). Estos resultados se asemejan a los obtenidos para los bacteroides de LPU83, demostrando que todavía hay una gran cantidad de genes involucrados en el proceso de desarrollo y diferenciación de los bacteroides que no han sido estudiados. Por otro lado, también muestra el gran cambio que sufren los bacteroides en el metabolismo, con aproximadamente el 50% de los genes alterados disminuyendo su expresión dentro de los bacteroides.

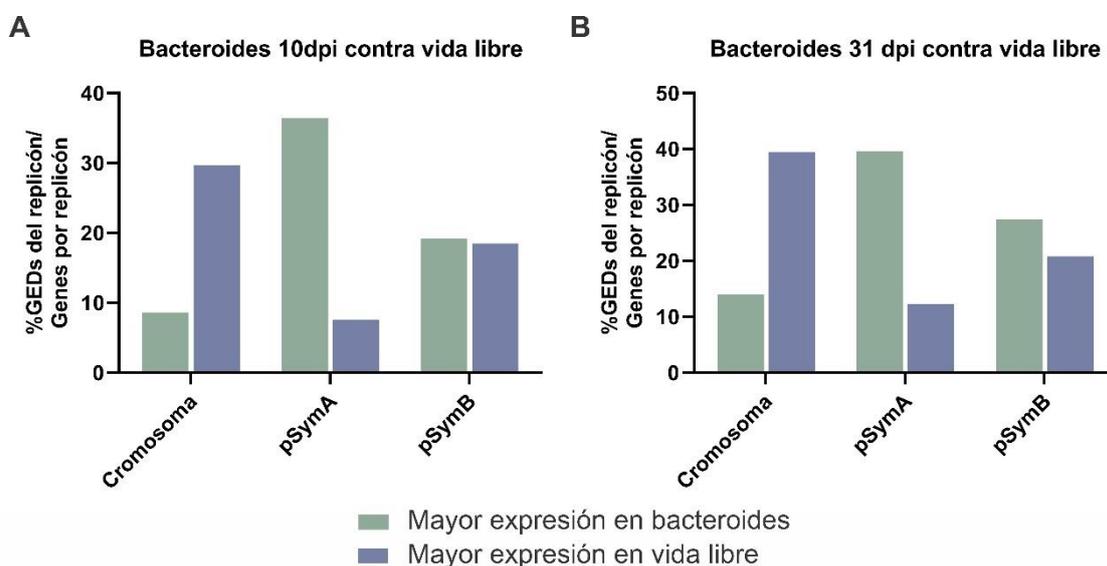


Figura IV.8. Distribución de GEDs en los replicones de Sm2011. A. Porcentaje de GEDs respecto al total de genes por replicón en la comparación bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre. **B.** Porcentaje de GEDs respecto al total de genes por replicón en la comparación bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre.

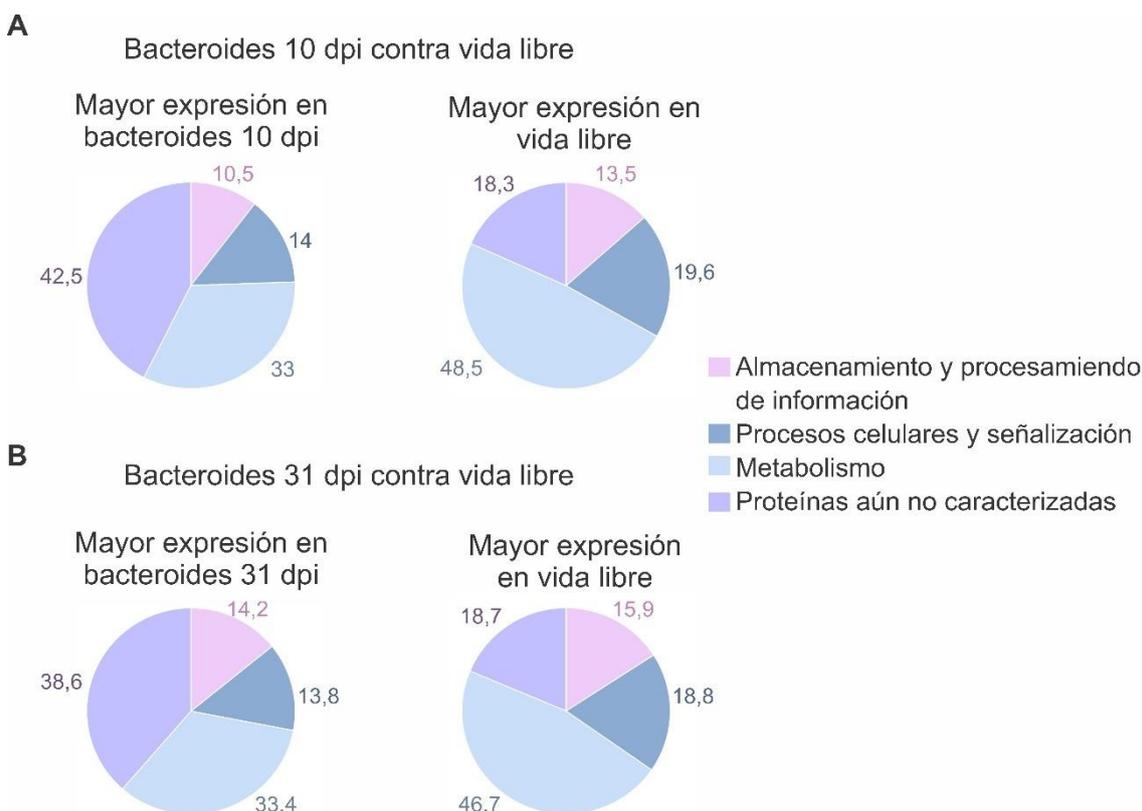


Figura IV.9. Distribución de GEDs de Sm2011 en las cuatro categorías generales de COGs. Se indica el porcentaje de los GEDs correspondientes a cada categoría para las dos comparaciones **A**. Bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre y **B**. Bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre.

Específicamente dentro de cada categoría general de COG, dentro de los GEDs con mayor expresión en los bacteroides a 10 dpi, la principal categoría representada es producción y conversión de energía (C), metabolismo y transporte de iones inorgánicos (P), seguida de transcripción (K) (Figura IV.10.A). Dentro de las categorías más representadas entre los genes con mayor expresión en vida libre en esta comparación se encuentra metabolismo y transporte de carbohidratos (G) y aminoácidos (E), seguido de biogénesis de membrana y pared celular (M) (Figura IV.10.A). Una distribución similar se observa para la comparación de bacteroides a 31 dpi contra bacterias en vida libre (Figura IV.10.B), donde las categorías más representadas para los genes con mayor expresión en bacteroides 31 dpi son las mismas que a 10 dpi (C, P, K y E). Por otro lado, en las bacterias en vida libre se encuentran representadas en mayor medida las categorías de transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (C y E), biogénesis de membrana y pared celular (M) y traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J) (Figura IV.10.B).

Si se comparan los gráficos de distribución de COGs para LPU83 (Figura IV.6) y para Sm2011 (Figura IV.10) se observa que en los bacteroides de LPU83 aumenta en gran medida la cantidad de genes de la categoría de replicación del ADN (L), lo cual no se observa en los bacteroides de Sm2011, que tiene una cantidad de genes similar entre

aquellos que aumentan y disminuyen su expresión en los bacteroides. Lo opuesto vemos con la categoría M, correspondiente a biogénesis de membrana y pared celular, la cual se ve claramente aumentada en las bacterias en vida libre de Sm2011 (disminuye su expresión en el nódulo) pero no así en las de LPU83. Dado que para la diferenciación de los bacteroides es necesaria la endorreduplicación de su ADN, es llamativo que el número de genes implicados en replicación de ADN no cambie sustancialmente. A diferencia de esto, parece ser más relevante la disminución de los genes involucrados en biosíntesis de membrana en los bacteroides eficientes.

Por otro lado, la comparación entre bacteroides a 31 dpi contra aquellos a 10 dpi para Sm2011 mostró que el porcentaje de genes por replicón que aumentaba su expresión a ambos tiempos era similar para los genes del cromosoma y el plásmido pSymA (Figura IV.11.A). Sin embargo, la diferencia se observó en el porcentaje de genes del plásmido pSymB que aumenta su expresión en los bacteroides a 31 dpi (13%), mientras que menos de un 5% de sus genes aumenta su expresión en los bacteroides a 10 dpi (Figura IV.11.A). Un mayor porcentaje de GEDs correspondientes a

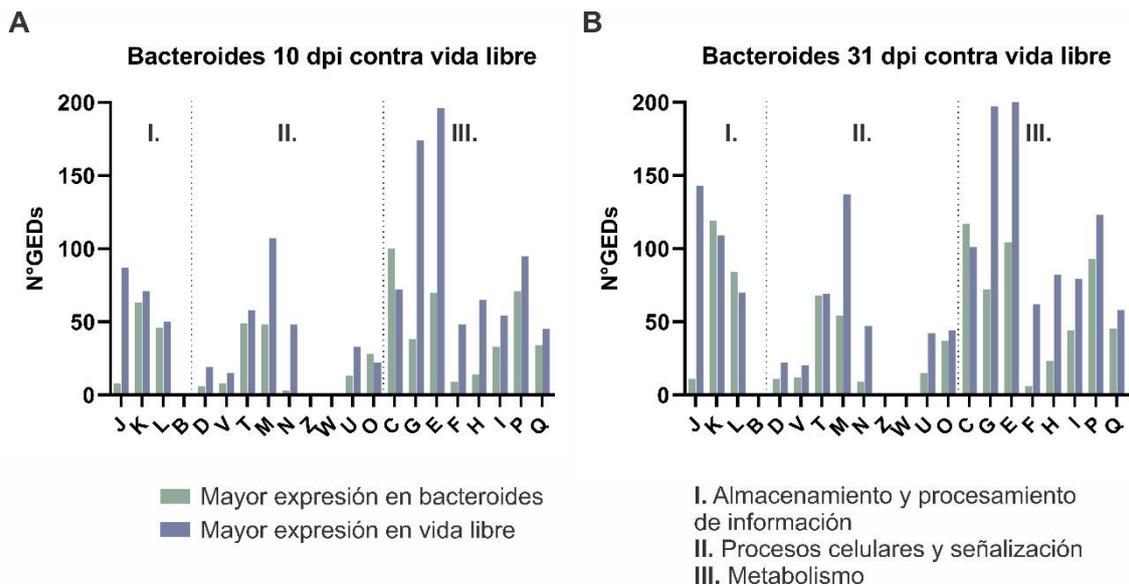


Figura IV.10. Representación de COGs entre los genes diferencialmente expresados de Sm2011. A. Comparación entre bacteroides 10 dpi y bacterias en vida libre. **B.** Comparación entre bacteroides 31 dpi y bacterias en vida libre. Las letras en las figuras corresponden a las categorías funcionales de la siguiente manera: J: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis; K: Transcripción; L: replicación, recombinación y reparación del ADN; B: Dinámica y estructura de la cromatina; D: Control del ciclo celular, división celular y división del cromosoma; V: Mecanismos de defensa; T: Mecanismos de transducción de señales; M: Biogénesis de membrana/pared celular; N: Movilidad celular; Z: Citoesqueleto; W: Estructuras extracelulares; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas; O: Modificaciones postraduccionales, renovación de proteínas y chaperonas; C: Producción y conversión de energía; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios.

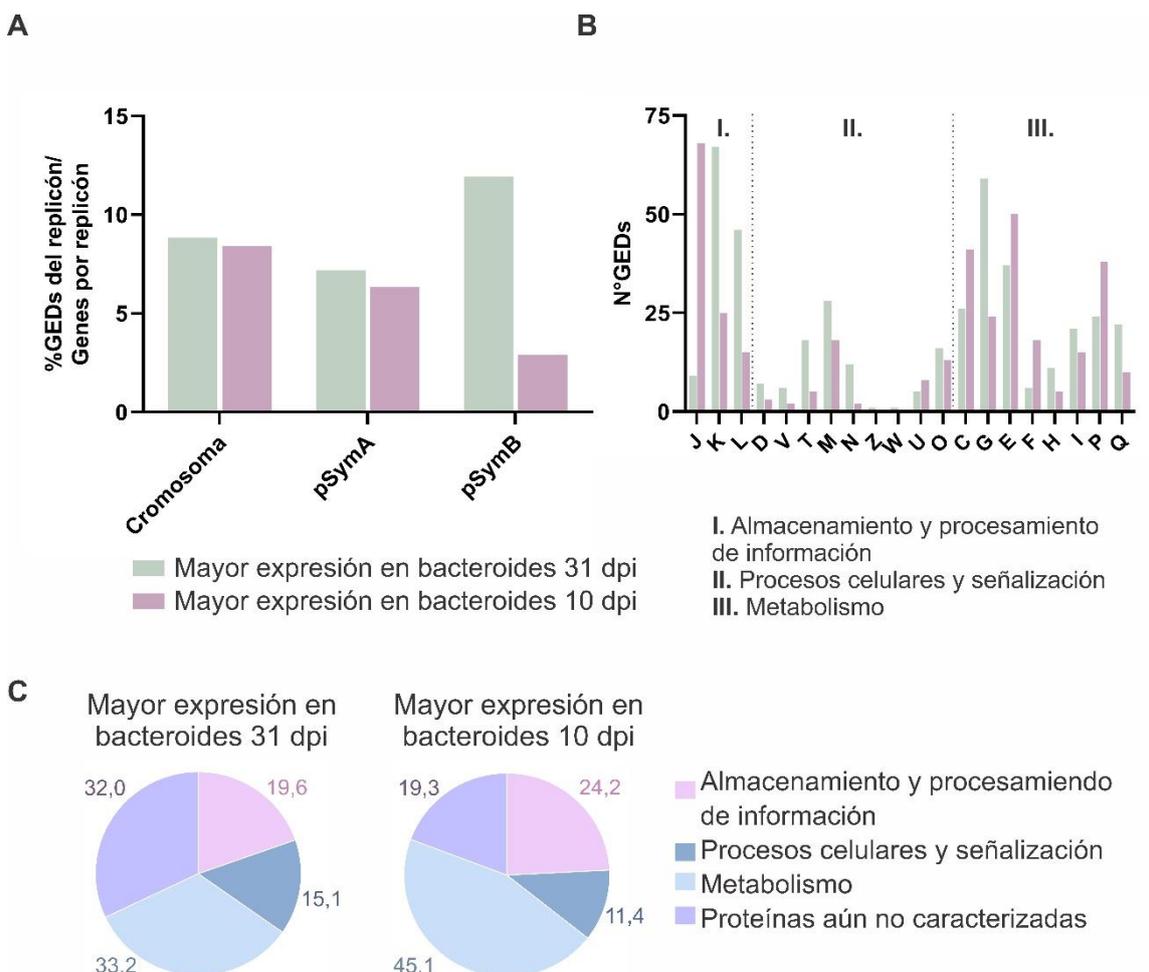


Figura IV.11. Comparación entre transcriptomas de bacteroides de Sm2011 a 31 dpi contra bacteroides a 10 dpi. A. Distribución de GEDs entre los genes totales de cada replicón de Sm2011 para esta comparación. **B.** Porcentaje de GEDs pertenecientes a cada categoría de COGs. Las letras en las figuras corresponden a las categorías funcionales de la siguiente manera: J: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis; A: Procesamiento y modificación de ARN; K: Transcripción; L: replicación, recombinación y reparación del ADN; B: Dinámica y estructura de la cromatina; D: Control del ciclo celular, división celular y división del cromosoma; Y: Estructura nuclear; V: Mecanismos de defensa; T: Mecanismos de transducción de señales; M: Biogénesis de membrana/pared celular; N: Movilidad celular; Z: Citoesqueleto; W: Estructuras extracelulares; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas; O: Modificaciones postraduccionales, renovación de proteínas y chaperonas; X: Mobiloma, profagos y transposones; C: Producción y conversión de energía; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios. **C.** Distribución de GEDs entre las categorías generales de COGs.

metabolismo se encuentran sobreexpresados a 10 dpi con respecto a los bacteroides a 31 dpi (Figura IV.11.C). En la distribución de COGs se observa que, para los genes con mayor expresión en bacteroides 31 dpi, las categorías más representadas son las de transcripción (K), transporte y metabolismo de carbohidratos (G) y replicación, recombinación y reparación del ADN (L) (Figura IV.11.B). Mientras que, para los GEDs con mayor expresión en bacteroides 10 dpi, la categoría más representada es la de estructura ribosomal y biogénesis (J), seguida por transporte y metabolismo de

aminoácidos e iones inorgánicos (E y P) y producción y conversión de energía (C) (Figura IV.11.B). Esto sugiere que los genes que se inducen en los bacteroides eficientes, cuando comienza el proceso, tienden a estar involucrados con la síntesis de proteínas y, a medida que el nódulo se desarrolla, se enfocan en el metabolismo del ADN y los cambios transcripcionales en el nódulo, lo que sugiere una gran adaptación de las funciones celulares.

IV.4.3. Bacteroides eficientes e ineficientes: genes ortólogos y su comportamiento

Para poder comparar la expresión de genes previamente descritos como involucrados en simbiosis entre los bacteroides de Sm2011 y LPU83, en primer lugar, se obtuvo una lista de genes ortólogos entre estas dos bacterias mediante la plataforma EDGAR (Blom *et al.*, 2016), encontrándose 3452 genes. Para cada gen de LPU83 y su correspondiente ortólogo en Sm2011, se le asignó el valor de *Log₂FoldChange* y su *adjusted p-value* para cada comparación previamente realizada (es decir, tomando como ejemplo la comparación bacteroides 10 dpi contra vida libre, cada gen tendrá dos valores de *Log₂FoldChange* y *adjusted p-value*, uno para cada bacteria, LPU83 y Sm2011). De esta manera, se puede analizar el comportamiento del gen en cada una de estas bacterias y evaluar su cambio entre bacteroides eficientes e ineficientes. De esta manera, podemos encontrar genes con igual tendencia en su expresión, por ejemplo, prendidos o apagados en los bacteroides o con tendencias inversas, prendidos en bacteroides de LPU83 y apagados en bacteroides de Sm2011 (o viceversa).

IV.4.3.A. Genes ortólogos con igual tendencia de expresión

Dentro de los genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011, hay genes que tienen el mismo patrón de expresión: se expresan más en los bacteroides con respecto a las bacterias en vida libre y lo opuesto, disminuyen su expresión en los bacteroides con respecto a la vida libre. Estos genes ortólogos se encontraron en las tres comparaciones realizadas: bacteroides a 10 y 31 dpi, y entre estos dos tiempos. El resumen de la cantidad de genes encontrados con el mismo comportamiento en las comparaciones se encuentra en la tabla IV.14. Cerca de 200 genes ortólogos se encuentran aumentados y 500 disminuidos en los bacteroides de LPU83 y Sm2011 en ambos tiempos (10 y 31 dpi) al comparar contra bacterias en vida libre. Comparando ahora los bacteroides a 31 dpi contra 10 dpi, solo 50 genes ortólogos se comportan igual a 31 dpi (mayor expresión) y 13 genes a 10 dpi. Las tablas de genes completas se encuentran en el Anexo (Tablas A23-A25).

Tabla IV.14. GEDs ortólogos con igual tendencia dentro de los bacteroides de LPU83 y Sm2011. Se indica la cantidad de GEDs (LFC mayor a 1,5 o menor a -1,5 y *adjusted p-value* menor a 0,05) con igual tendencia al comparar genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011.

	Bacteroides 10 dpi	Bacteroides 31 dpi
Mayor expresión en los bacteroides	198	256
Mayor expresión en vida libre (disminuido en bacteroides)	576	523
Bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi		
Mayor expresión bacteroides 31 dpi	50	
Mayor expresión bacteroides 10 dpi	13	

Dentro de este grupo de genes ortólogos con igual comportamiento entre bacteroides eficientes e ineficientes, con mayor expresión en los bacteroides a 10 dpi, encontramos genes involucrados en la fijación de nitrógeno como los genes *nif*, que conforman el complejo de la nitrogenasa y otros genes *nod* y *fix*. Estos genes específicos y tan relevantes para la FBN serán estudiados puntualmente en el capítulo VI.

IV.4.3.B. Genes ortólogos con expresión inversa

Como se mostró en la sección anterior, hay alrededor de 700 genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011 por condición que muestran patrones similares de disminución o sobreexpresión dentro de los bacteroides. Otro grupo de genes son aquellos que poseen expresión diferencial, pero en sentido opuesto entre los bacteroides eficientes e ineficientes, es decir: genes que se inducen en los bacteroides de Sm2011 pero sus ortólogos en LPU83 disminuyen su expresión en la misma condición y, la condición inversa, genes que se inducen en bacteroides de LPU83, pero su ortólogo en Sm2011 disminuye su expresión, comparándolos al mismo tiempo (10 o 31 dpi). Como se observa en la tabla IV.15, sorprendentemente hay pocos genes con este tipo de comportamiento: sólo 33 genes ortólogos tienen patrones de expresión opuestos en la comparación bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre, y únicamente 41 genes en la comparación entre bacteroides 31 dpi y bacterias en vida libre. La lista completa de genes se encuentra en el Anexo (Tablas A26-A27).

Tabla IV.15. Genes ortólogos con expresión inversa entre bacteroides eficientes e ineficientes en la fijación de N. Bacteroides 10 dpi o bacteroides 31 dpi corresponden a las comparaciones “Bacteroides 10 dpi contra vida libre” y “Bacteroides 31 dpi contra vida libre”. Inducido en bacteroides Sm2011 indica genes con $Log_2FoldChange$ mayor a 1,5 en Sm2011 y sus ortólogos en LPU83 con $Log_2FoldChange$ menor a -1,5. Inducido en bacteroides LPU83 indica genes con $Log_2FoldChange$ mayor a 1,5 en LPU83 y sus ortólogos en Sm2011 con $Log_2FoldChange$ menor a -1,5. Ambos genes con *adjusted p-value* menor a 0,05.

	Inducido en bacteroides Sm2011, disminuido en bacteroides LPU83	Inducido en bacteroides LPU83, disminuido en bacteroides Sm2011	Total genes por comparación
Bacteroides 10 dpi	8	25	33
Bacteroides 31 dpi	14	27	41
Total genes por bacteria	22	52	

Se clasificaron los genes ortólogos con expresión inversa de acuerdo a su pertenencia a grupos de genes ortólogos (COGs). Del total de 22 genes ortólogos inducidos en bacteroides eficientes de Sm2011, sin importar la comparación, el 42% de los genes pertenece a la categoría de metabolismo, 21% a almacenamiento y procesamiento de información, 21% a procesos celulares y señalización y 17% a proteínas con función desconocida. Por otro lado, el 40% de los 52 genes con mayor expresión en bacteroides ineficientes (LPU83) se encuentran en la categoría de metabolismo, 23% en procesos celulares y señalización y, 26% en la categoría de proteínas con función desconocida. Finalmente, la categoría almacenamiento y procesamiento de información se encuentra formada por un 11 % de los genes con mayor expresión en bacteroides de LPU83. En total, 19 genes (4 de Sm2011 y 15 de LPU83) con expresión opuesta son genes cuya función es desconocida y debido al comportamiento opuesto descrito, consideramos que hemos definido un conjunto de potenciales genes clave para el correcto funcionamiento de los bacteroides en la fijación biológica de N.

De esta manera, se lograron identificar grupos distintos de genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011, basados en diferencias a nivel de expresión genética. Esto permitirá identificar genes de interés a la hora de estudiar su importancia en el fenotipo simbiótico de las cepas.

IV.5. Conclusiones parciales

En este capítulo se analizó el transcriptoma de nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de nitrógeno. Los resultados de esta secuenciación mostraron que la calidad de las muestras fue buena y que las réplicas fueron adecuadas. El análisis del transcriptoma de *M. truncatula* mostró cambios en la expresión de genes al comparar nódulos eficientes e ineficientes, encontrando respuestas diferenciales en la expresión de NCRs, genes descritos como claves en el desarrollo de un nódulo eficiente en la

FBN. Esto se ha observado durante todo el análisis realizado, por lo que al ser tan relevantes en el desarrollo del nódulo los abordaremos en profundidad en el capítulo VII. El análisis de enriquecimiento de genes con mayor expresión en nódulos eficientes mostró tanto procesos biológicos como funciones moleculares relacionadas al oxígeno enriquecidos. Mientras que, para los genes con mayor expresión en los nódulos ineficientes, detectamos enriquecida la respuesta de defensa de la planta. Además de los genes y funciones diferentes entre los nódulos eficientes e ineficientes en la fijación de N, se encontraron conjuntos de genes que se expresan tanto en nódulos eficientes como ineficientes, lo cual brinda un panorama más amplio sobre los determinantes involucrados en simbiosis.

Por otro lado, el análisis de los transcriptomas bacterianos mostró grandes cambios en el transcriptoma de las bacterias dentro de los nódulos. Principalmente, se encontraron genes involucrados en el metabolismo bacteriano y genes con función desconocida, demostrando la escasa información que hay respecto a los genes involucrados en este intercambio simbiótico. En cuanto a la comparación de genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011, se detectaron 74 genes con expresión inversa entre los dos tipos de bacteroides. Este resultado muestra que a pesar de que la respuesta general al desarrollo del nódulo sea muy distinta entre estos tipos de bacteroides, las diferencias a nivel transcriptómico no parecen ser tan profundas a nivel de genes ortólogos entre las cepas. Esto sugiere que las grandes diferencias podrían deberse a genes ausentes en los nódulos ineficientes o presencia de genes que inducen una respuesta distinta por parte de la planta. Asimismo, 20 de estos genes no tienen una función asignada, por lo que los hace potenciales objeto de estudio para avanzar con el conocimiento de los genes implicados en el proceso de diferenciación. La expresión de genes involucrados en los distintos procesos que ocurren en los bacteroides será analizada en los siguientes capítulos. Los resultados en cuanto a la distribución de COGs en los genes diferenciales de LPU83, sugieren nuevamente que hay una falla en la diferenciación de las bacterias en bacteroides. En el próximo capítulo, se analizarán diferentes aspectos del proceso de diferenciación de las bacterias en bacteroides, con el objetivo de determinar si alguno de ellos está fallando en los nódulos de *M. truncatula* infectada con LPU83.

Capítulo V:
**Alteraciones transcripcionales,
morfológicas y fisiológicas de los
bacteroides en nódulos ineficientes**



V.1. Introducción

Dentro de los nódulos, los rizobios se encuentran en estructuras denominadas simbiosomas, envueltas en una membrana derivada de la pared celular vegetal. Durante el desarrollo del nódulo, las bacterias se adaptan a este ambiente mediante distintos cambios morfológicos y fisiológicos. Los cambios que las bacterias pueden sufrir varían entre las distintas leguminosas (Montiel *et al.*, 2016); en algunas especies los bacteroides son similares a las células en vida libre y su estado de simbiote fijador es reversible, mientras que en otras especies sufren grandes cambios en su estilo de vida, entre ellos morfológicos, que son irreversibles (Kondorosi *et al.*, 2013). Dentro de este último grupo se encuentran las leguminosas pertenecientes al clado IRLC, como *Medicago* spp. Las células simbióticas de este tipo de leguminosas aumentan su tamaño y se encuentran ocupadas con bacteroides, los cuales se encuentran elongados y ramificados. Este proceso de diferenciación de los bacteroides se encuentra regulado por la planta, específicamente por péptidos ricos en cisteína específicos de nódulo (NCRs, “*nodule cystein-rich peptides*”) (Mergaert *et al.*, 2006). Estos péptidos inducen el crecimiento de los bacteroides y la endoreduplicación de su genoma, lo cual genera una diferenciación terminal. Se ha demostrado que el NCR247 interactúa con el regulador transcripcional CtrA y distintas proteínas del ciclo celular que llevan a que éste se detenga (Penterman *et al.*, 2014). Como resultado, el contenido de ADN de los bacteroides puede ser hasta 24 veces mayor que las bacterias en vida libre (Kondorosi *et al.*, 2013). La membrana de los bacteroides sufre una permeabilización (Mergaert *et al.*, 2006) y, a su vez, las bacterias pierden la capacidad de crecer nuevamente fuera del nódulo. Este hecho también se estima está relacionado al propio proceso de endoreduplicación que evita la citoquinesis.

En el capítulo previo, mediante el análisis transcriptómico, se detectó la expresión diferencial de genes de la planta asociados a una respuesta de defensa de la misma en nódulos generados por LPU83, que podría estar generando la muerte bacteriana dentro del nódulo. A su vez, detectamos en la bacteria la alteración de genes relacionados a la división celular. Debido a estas características halladas, en este capítulo se estudiarán las características morfológicas y fisiológicas de los bacteroides eficientes e ineficientes en la FBN, con el fin de determinar si las respuestas transcriptómicas encontradas previamente se correlacionan con cambios fenotípicos en el nódulo.

V.2. Expresión de genes involucrados en la división celular

Se ha descrito que, durante la diferenciación celular, los NCRs interrumpen la división celular, sin generar cambios en el proceso de endorreduplicación del ADN. Ensayos con concentraciones subletales del NCR247 mostraron que este péptido altera la expresión del regulador maestro del ciclo celular CtrA y diversos genes necesarios para la división celular (Penterman *et al.*, 2014). Durante el análisis de la expresión genética dentro de los nódulos se observó que una gran cantidad de GEDs con COGs asignados a la categoría de metabolismo del ADN. Para determinar si la endorreduplicación y detención de la división celular se veía reflejada en una alteración en la expresión genética en los nódulos ineficientes, se decidió evaluar la expresión de estos genes en ambos tipos de nódulos. Se determinó la expresión de estos genes en Sm2011 y en los ortólogos en LPU83.

En la tabla V.1 se indican los valores de $\log_2\text{Foldchange}$ para las comparaciones de bacteroides 10 y 31 dpi contra vida libre para cada bacteria. Cabe destacar que ninguno de estos genes presentó un mayor nivel de expresión en los bacteroides que en vida libre: no presentaron diferencias significativas o disminuyen su expresión en los bacteroides. El regulador maestro *ctrA* disminuye su expresión dentro de los bacteroides a 31 dpi tanto en LPU83 como en Sm2011. Distintos genes han sido predichos como parte del regulón de esta proteína, entre ellos *divJ* y *rem* (De Nisco *et al.*, 2014, Penterman *et al.*, 2014). Este último gen se encuentra disminuido dentro de los bacteroides tanto a 10 como a 31 dpi y en ambos tipos de nódulos (Tabla V.1). Sin embargo, el regulador *divJ* disminuye únicamente su expresión en los bacteroides de Sm2011. Por otro lado, el regulador del ciclo celular *divK* disminuye su expresión en los bacteroides a 31 dpi de Sm2011 con respecto a las bacterias en vida libre, pero no así los bacteroides de LPU83, en los cuales su expresión no varía significativamente. Los genes *ftsK* y *ftsZ* necesarios para división celular presentan el mismo comportamiento: en los bacteroides a 10 dpi, su expresión disminuye tanto en los bacteroides de LPU83 como en aquellos de Sm2011. Sin embargo, a 31 dpi los bacteroides de LPU83 no presentan diferencias con la expresión en vida libre, mientras que la expresión de estos genes en los bacteroides de Sm2011, continúa disminuida. El gen *gcrA*, que promueve la activación de CtrA, presenta diferencias significativas entre los bacteroides y las bacterias en vida libre únicamente en la comparación para LPU83. La proteína que inicia la replicación del ADN, codificada por el gen *dnaA*, disminuye su expresión únicamente en los bacteroides de Sm2011 a 31 dpi. Los cambios en la expresión de estos genes sugieren que la detención de la división celular en LPU83 a 31 dpi no sería tan marcada como en Sm2011 y que la replicación del ADN continúa.

Tabla V.1. Expresión de genes relacionados a la división celular y replicación del ADN. Se muestran los valores de $\log_2\text{FoldChange}$ para las comparaciones bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre y bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre para LPU83 y Sm2011. Se indican únicamente las comparaciones con *adjusted p-value* menor a 0,05. Los valores negativos de $\log_2\text{FoldChange}$ indican una mayor expresión en las bacterias en vida libre (disminuye la expresión en el nódulo) con respecto a los bacteroides.

Gen	Bacteroides 10 dpi contra vida libre		Bacteroides 31 dpi contra vida libre	
	LPU83	Sm2011	LPU83	Sm2011
<i>ctrA</i>	-	-	-2,0	-1,9
<i>divK</i>	-	-	-	-2,7
<i>divJ</i>	-	-2,6	-	-2,6
<i>dnaA</i>	-	-	-	-3,1
<i>ftsK</i>	-1,9	-4,3	-	-3,0
<i>ftsZ</i>	-1,8	-3,0	-	-2,7
<i>gcrA</i>	-1,7	-	-2,2	-
<i>ndvA</i>	-	-	-	-1,6
<i>rem</i>	-1,5	-5,7	-3,1	-5,0

V.3. Caracterización morfológica de nódulos mediante microscopía electrónica de barrido

Los resultados obtenidos mediante la transcriptómica dual y el fenotipo observado en los nódulos de LPU83 sugieren que hay una falla en la diferenciación de los bacteroides dentro de los nódulos. Los genes relacionados al metabolismo del ADN y la membrana celular se encuentran diferencialmente expresados y entre las categorías más representadas en los bacteroides de LPU83 y Sm2011. Para estudiar en mayor detalle los nódulos se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) de cortes de nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula* infectados con bacterias eficientes e ineficientes. En la figura V.1. se observa en primer lugar una sección del nódulo y luego una célula simbiótica vegetal con los bacteroides dentro. En ambas especies de *Medicago* spp. a 31 dpi se advierte que las bacterias de Sm2011 se encuentran alargadas, mientras que las bacterias de LPU83 dentro de los nódulos no presentan esta forma, son más pequeñas e incluso parecen formar agregados o estar recubiertas por algún tipo de película. La falta de elongación observada por las técnicas previas en los nódulos de LPU83 planteó la incógnita de cuan extensivo es el fenotipo y si había diferencias significativas en el largo de las bacterias a distintos tiempos post inoculación. Por ello, se colectaron nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula* infectados con Sm2011, LPU83 y Sma818B a diferentes tiempos post inoculación, se aislaron las bacterias de los nódulos y se analizaron mediante SEM. En la figura V.2. se observan las imágenes obtenidas para ambas especies de *Medicago* spp. en tres tiempos distintos. Como control se

utilizaron las bacterias en vida libre. Para los bacteroides de Sm2011 en ambas plantas y en los tres tiempos post inoculación estudiados, se observan bacteroides más largos que aquellos en vida libre e incluso bastantes con ramificaciones, un fenotipo reportado para *S. meliloti* (Vasse *et al.*, 1990, Mergaert *et al.*, 2006). En cambio, las bacterias recuperadas de los nódulos infectados con LPU83 no presentan este fenotipo: se observan bacterias sin grandes diferencias con aquellas en vida libre, tanto en *M. truncatula* como en *M. sativa*, en todos los tiempos estudiados. Finalmente, para las bacterias recuperadas de nódulos infectados por Sma818B, en *M. sativa* se observan tanto bacteroides alargados como bacteroides con un tamaño similar a las bacterias en vida libre. En *M. truncatula*, los bacteroides de Sma818B parecen alargarse a tiempos más largos, observándose una mayor cantidad de bacterias elongadas e incluso algunas presentando ramificaciones a 31 dpi.

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido como se muestra en la figura V.2., se procedió a medir individualmente el largo de los bacteroides dentro de los nódulos a 14, 21 y 31 dpi, así como también de las bacterias en vida libre. Como se muestra en la Figura V.3, los bacteroides de Sm2011 son significativamente más largos que las bacterias en vida libre, y se observa que el largo es progresivamente mayor a medida que el nódulo se desarrolla, tanto en *M. sativa* (Figura V.3.A) como en *M. truncatula* (Figura V.3.B). En cambio, para el caso de LPU83, en *M. sativa* no se observa que el tamaño de las bacterias aumente dentro de los nódulos en comparación con el largo de las bacterias en vida libre. En *M. truncatula*, las bacterias de LPU83 recuperadas de los nódulos no aumentan su tamaño e incluso las mediciones sugieren que este fenotipo es más severo que en *M. sativa*. La cepa quimera, Sma818B, presenta un fenotipo particular: en *M. sativa* los bacteroides aumentan su tamaño a medida que se desarrolla el nódulo, teniendo el mayor tamaño en los nódulos a 31 dpi, mientras que las bacterias recuperadas de los nódulos de *M. truncatula*, a pesar de que también aumentan su largo, no llega a ser el mismo que el observado en alfalfa. Estos resultados indican que LPU83 no se está elongando como sí sucede con la cepa eficiente en la FBN, Sm2011, lo cual reafirma una falla en el proceso de diferenciación en bacteroides.

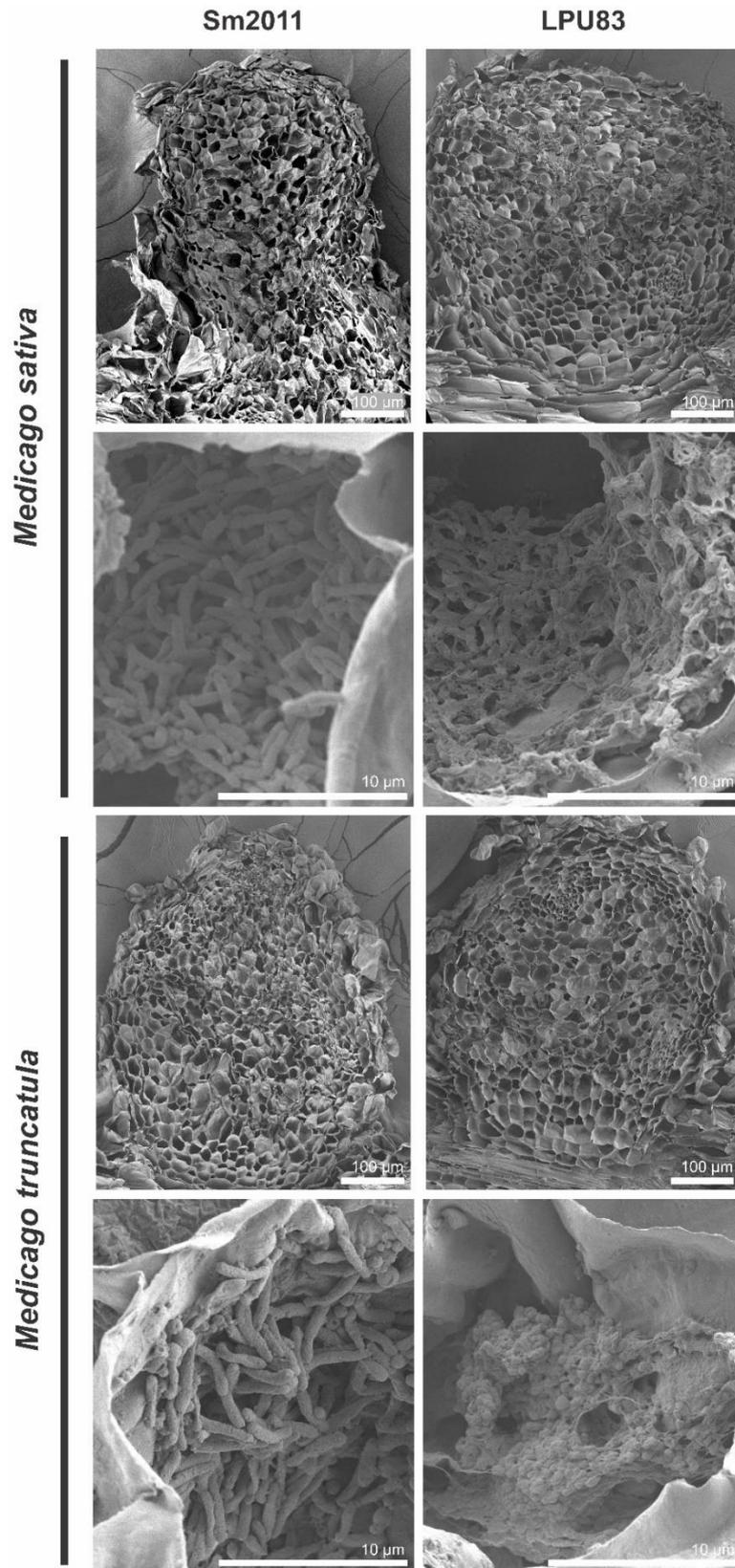


Figura V.1. Microscopía electrónica de barrido de nódulos eficientes e ineficientes en la FBN. Microscopía de nódulos enteros de *M. sativa* y *M. truncatula* infectada con Sm2011 (A-D) y LPU83 (E-H). Las figuras B, D, F y H corresponden a una ampliación de una célula vegetal. Las escalas se indican como una barra blanca en cada imagen y se indica el tamaño al que corresponden.

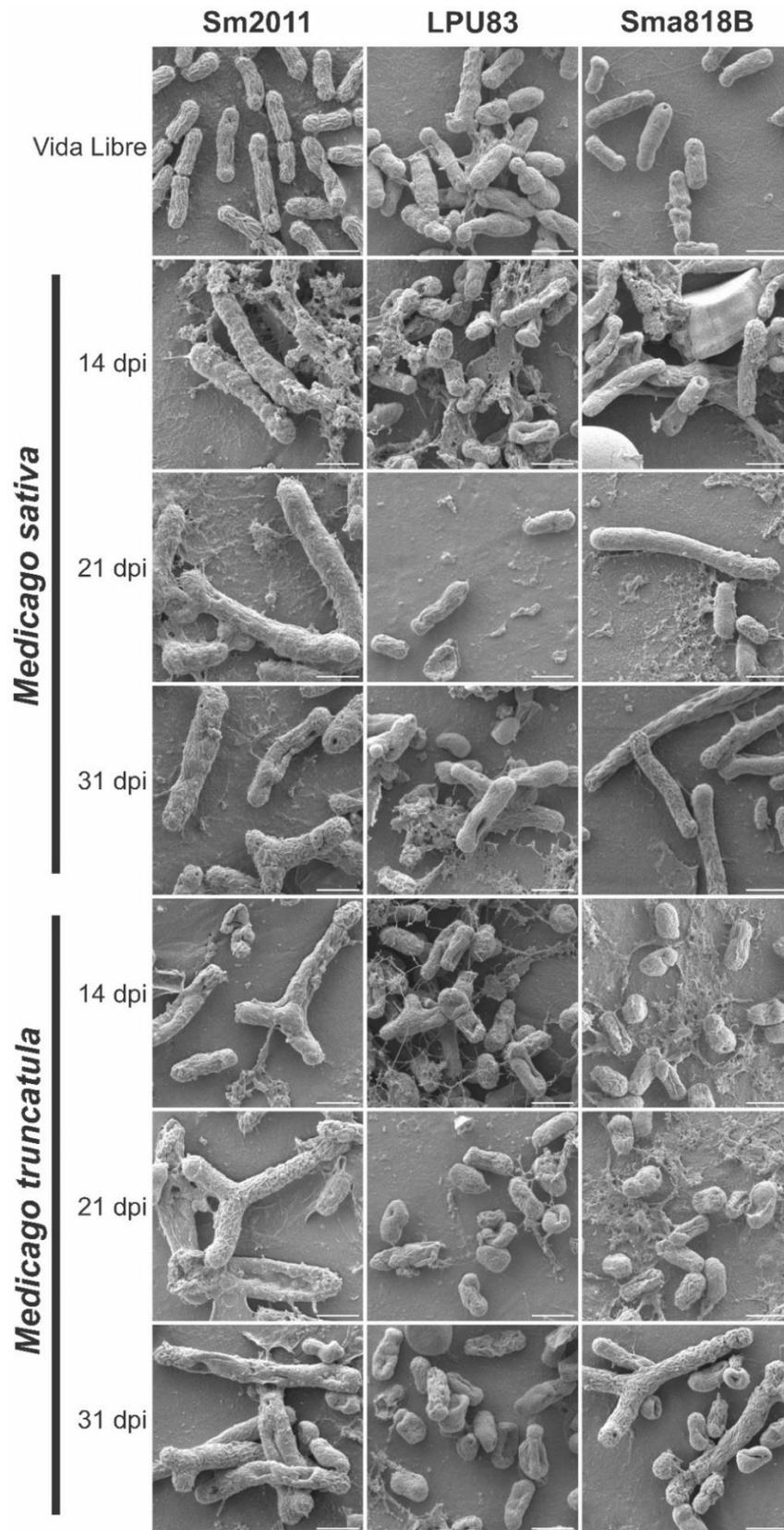


Figura V.2. Observaciones al microscopio electrónico de barrido de bacterias en vida libre y bacterias aisladas de nódulos. Bacterias aisladas de nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula* a 14, 21 y 31 dpi. Plantas infectadas con Sm2011, LPU83 y Sma818B. La escala se indica como una barra blanca en cada imagen y corresponde a 1 μ m.

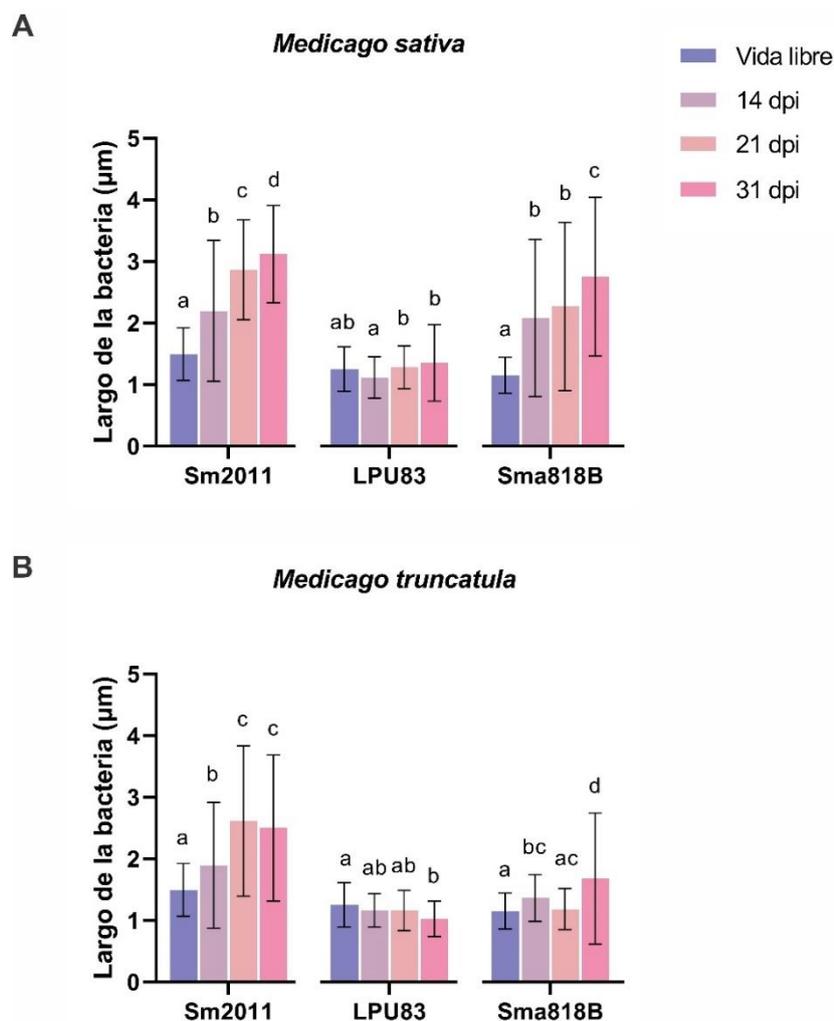


Figura V.3. Largo de las bacterias y bacteroides aisladas de nódulos. Largo de bacteroides de nódulos de **A.** *M. sativa* y **B.** *M. truncatula* de 14, 21 y 31 dpi y bacterias en vida libre. Se indican los valores promedios y su desviación estándar. Los cortes de nódulo se fijaron y observaron al microscopio electrónico de barrido. A partir de las imágenes se midió el largo de al menos 100 bacterias, para cada condición. ANOVA realizado para los largos de cada cepa individualmente. Letras distintas indican diferencias significativas con test de Tukey p -value menor a 0,05.

V.4. Viabilidad y endopoliploidía de los bacteroides

En los tipos de nódulos indeterminados generados por *Medicago* spp., los bacteroides sufren una diferenciación terminal. En este proceso, las bacterias sufren cambios morfológicos (se alargan y ramifican), en su cantidad de DNA, en la estructura de su membrana, entre otros. Estos últimos, tienen como consecuencia que las bacterias no sean viables fuera del nódulo. Para continuar con la caracterización de las bacterias en los nódulos eficientes e ineficientes en la FBN, el estudio se centró en el estado de los bacteroides dentro de los nódulos, evaluando el recuento de bacterias viables de los mismos. Dichos nódulos se esterilizaron superficialmente, se molieron en solución fisiológica y se realizaron recuentos en medio TY, los cuales se expresaron como UFC por mg de nódulo húmedo. En la figura V.4 se muestran los resultados

obtenidos para nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula* a 14, 21 y 31 dpi. En cuanto a las bacterias viables recuperadas de los nódulos de LPU83, se observó el mismo fenotipo en ambas especies de *Medicago* spp.: en todos los tiempos estudiados se obtuvo una mayor cantidad de bacterias de los nódulos de LPU83 que de aquellos generados por Sm2011. Al comparar LPU83 con Sma818B en *M. sativa*, en los tiempos analizados el recuento de viables fue siempre mayor en los nódulos de LPU83. En *M. truncatula*, únicamente no hubo diferencias en el número de bacterias viables a 21 dpi; en el resto de los tiempos analizados un menor número de bacterias se recuperaron de los nódulos de Sma818B con respecto a lo ocurrido para los nódulos de LPU83, repitiendo la misma tendencia que en *M. sativa*.

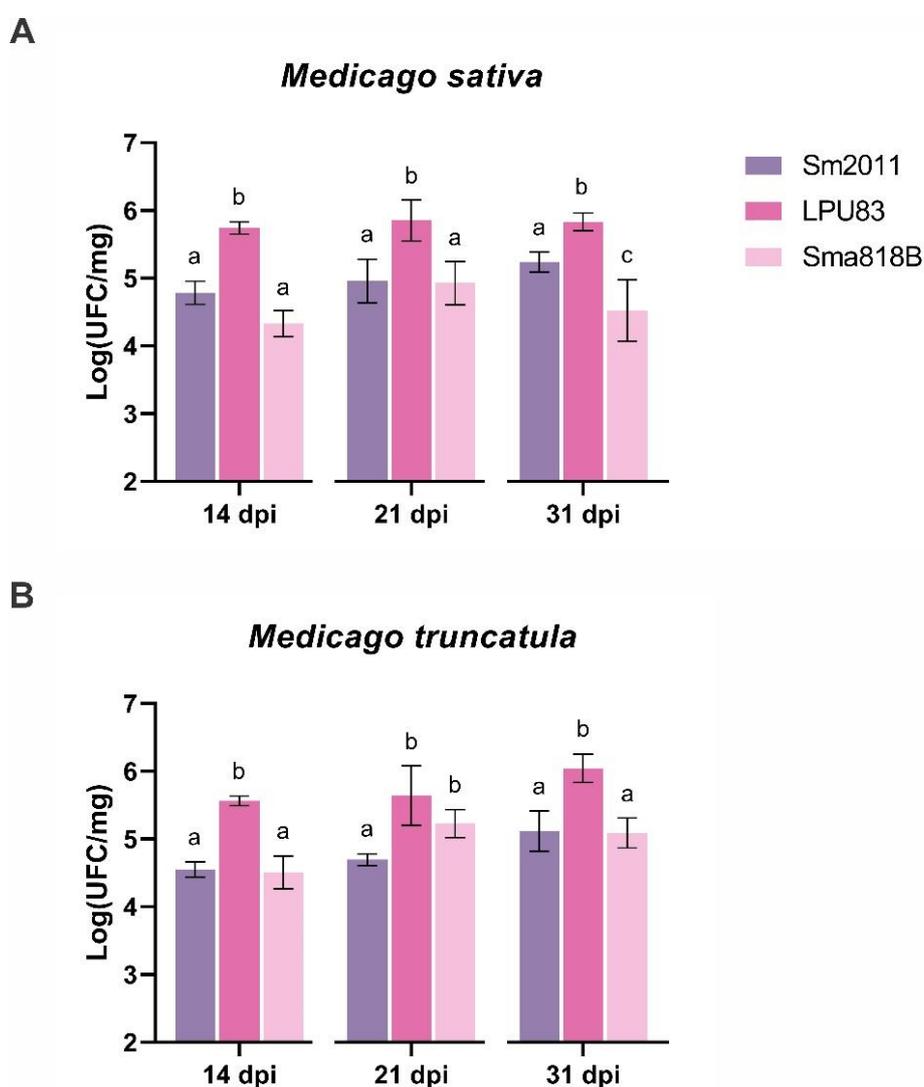


Figura V.4. Recuento de bacterias viables de nódulos. A. Nódulos de *M. sativa*. **B.** Nódulos de *M. truncatula*. Valores de UFC/mg de nódulo húmedo para nódulos de 14, 21 y 31 dpi infectados por Sm2011, LPU83 y Sma818B. Se muestran como el Log_{10} de UFC/mg, se graficaron el promedio y la desviación estándar. ANOVA con test de Tukey, realizado para cada tiempo post inoculación entre las distintas cepas. Letras distintas indican diferencias significativas con p -value menor a 0,05.

Otra característica de los bacteroides diferenciados es la endorreduplicación de su ADN. Este proceso se caracteriza por duplicaciones del ADN de la bacteria sin división celular. El hecho que *S. meliloti* pierda su capacidad de dividirse luego de la diferenciación terminal, se cree está ligado a la presencia de grandes cantidades de ADN dentro de la célula, que no permiten la formación del septum para la división celular y la distribución equitativa de los replicones (Kondorosi *et al.*, 2013). Mergaert *et al.* (2006) demostraron que en los bacteroides hay una correlación entre el tamaño de las células y el contenido de ADN. Debido a las observaciones realizadas que sostienen una falla en la diferenciación, se decidió evaluar si la endorreduplicación del ADN en los nódulos sucedía o no en los bacteroides ineficientes. Con ese fin, se midió la endopoliploidía de los bacteroides dentro de los nódulos. Para ello, se aislaron bacterias de nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula* infectadas con Sm2011, LPU83 y Sma818B, donde el contenido de ADN de las mismas fue evaluado. Por otro lado, también se midió el nivel de endorreduplicación del ADN en cultivos de las bacterias en vida libre a modo de control. En la tabla V.2 se observan los porcentajes de endopoliploidía obtenidos. Para el caso de Sm2011, el nivel en vida libre es de alrededor del 5%, mientras que dentro de los nódulos llega a aproximadamente al 50% en *M. sativa* y *M. truncatula*. En cambio, LPU83 tiene un porcentaje de 5% de las células con endopoliploidía en vida libre, y este valor no aumenta sustancialmente dentro de los bacteroides: es alrededor del 7% en *M. sativa* y 1% en *M. truncatula*, indicando que la endorreduplicación de su ADN no sucede. En el caso de Sma818B, el porcentaje de endopoliploidía de las células en vida libre es alto (15%), siendo similar en *M. sativa* y presentando un porcentaje de endopoliploidía menor en los nódulos de *M. truncatula*. El elevado porcentaje observado en vida libre para esta cepa parece estar relacionado a un problema en el cultivo bacteriano, ya que se evaluó nuevamente Sma818B en vida libre no mostró diferencias con Sm2011. En la figura V.5 se observan los histogramas normalizados para las cepas bacterianas y las tres condiciones analizadas. Los resultados muestran que, en los nódulos ineficientes, los bacteroides presentan un porcentaje de endorreduplicación menor y este valor encuentra un mínimo en los nódulos de *M. truncatula*, la especie en donde se observa el fenotipo más severo.

Tabla V.2. Porcentaje de endopoliploidía de las cepas utilizadas en este trabajo en vida libre y en nódulos de *Medicago spp.* Expresado como porcentaje de endopoliploidía de la célula junto con su desvío estándar. Resultado promedio de tres réplicas biológicas.

Cepa bacteriana	Vida libre	Nódulos de <i>M. sativa</i>	Nódulos de <i>M. truncatula</i>
Sm2011	4,57 ± 0,65	49,43 ± 3,40	55,0 ± 4,33
LPU83	3,03 ± 0,84	7,07 ± 1,22	0,97 ± 0,32
Sma818B	15,27 ± 3,75	16,53 ± 4,71	3,97 ± 0,76

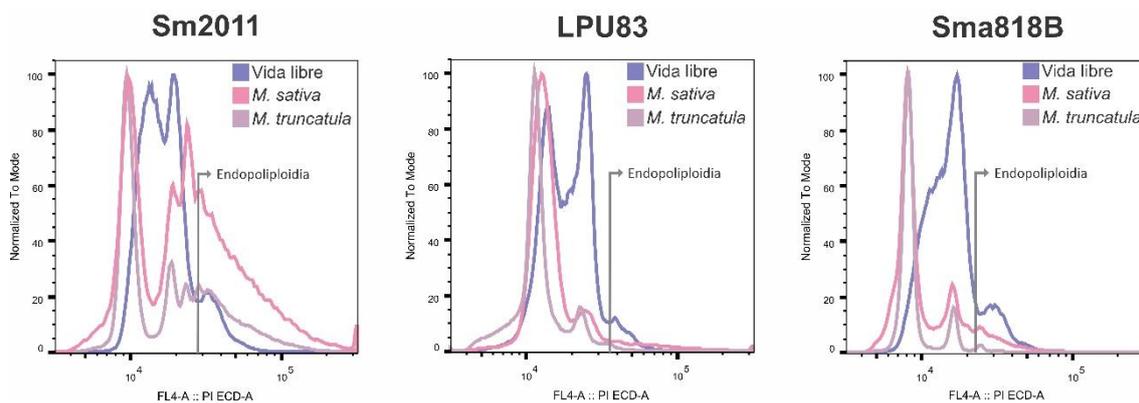


Figura V.5. Endorreduplicación de los genomas bacterianos. Para cada cepa bacteriana estudiada (Sm2011, LPU83 y Sma818B) y las tres condiciones analizadas (vida libre, nódulos de *M. sativa* y nódulos de *M. truncatula*) se muestran los histogramas correspondientes a la normalización del número de células analizadas y su concentración de yoduro de propidio, la cual es proporcional al contenido de ADN en la célula. Está técnica fue establecida por Margaert *et al.* (2006).

V. 5. Conclusiones parciales

Medicago sativa y *Medicago truncatula* generan nódulos del tipo indeterminados. Estos nódulos presentan bacteroides que sufren una diferenciación terminal (Mergaert *et al.*, 2006). Si bien había evidencias previas de que *R. favelukesii* genera nódulos defectivos en la simbiosis con alfalfa y la FBN es escasa (Wegener *et al.*, 2001), no se había caracterizado en profundidad a que nivel del desarrollo del nódulo se observan estas fallas. Los resultados presentados en este capítulo evidencian claramente la falla en la diferenciación de los bacteroides, que no se encuentran elongados ni ramificados, como se observó mediante distintos tipos de microscopía. El análisis de las longitudes de los bacteroides mostró que LPU83 no se alarga en los nódulos de *M. sativa* y *M. truncatula*, a diferencia de lo que sucede con los bacteroides de Sma818B, aunque en menor medida que lo observado para Sm2011. La incapacidad de replicarse del bacteroide fuera del nódulo, otra característica de los bacteroides con diferenciación terminal, no se observa en los nódulos de LPU83. En todos los tiempos medidos, tanto en *M. sativa* como en *M. truncatula*, se obtuvieron mayores recuentos de bacterias en placa para LPU83 que para Sm2011. A su vez, los bacteroides no estarían sufriendo una endorreduplicación de su ADN, al no observarse endopoliploidía en los mismos.

En general, en *M. truncatula* los fenotipos fueron más severos que en *M. sativa*. Esto fue particularmente observado en los nódulos de Sma818B, donde los bacteroides se encontraban más alargados y con un porcentaje de endorreduplicación mayor en los nódulos de *M. sativa*.

En este capítulo se ha evidenciado que a pesar de que en los nódulos ineficientes de LPU83 se induce una respuesta de defensa de la planta, esta no genera directamente una disminución de UFC dentro de los nódulos de LPU83. Sin embargo, se observa que

la diferencia de expresión en genes bacterianos relacionados a la división celular tiene como resultado la falta de elongación y de endorreducción del ADN dentro de los nódulos de LPU83. En el próximo capítulo, se estudiarán los genes involucrados directamente en el proceso de nodulación y fijación de N_2 por parte de la bacteria, con el fin de buscar otros determinantes que puedan estar alterados en este proceso.

Capítulo VI:
**Evaluación y expresión heteróloga de
genes simbióticos durante el desarrollo
de nódulos de *R. favelukesii***



VI.1. Introducción

El establecimiento de una correcta simbiosis fijadora de nitrógeno entre los rizobios y las leguminosas es un proceso complejo que requiere la expresión de una variedad de genes tanto de la planta como de la bacteria. De acuerdo a lo mencionado en la introducción general, la interacción comienza cuando metabolitos denominados flavonoides son liberados por las raíces de las plantas que se encuentran en suelos pobres en nitrógeno. Estos flavonoides se unen al regulador transcripcional bacteriano NodD que induce la expresión de distintos genes. Entre ellos se encuentran los genes *nod*, *noe* y *nol* que codifican para proteínas que producen y modifican los denominados factores de nodulación (factores nod, FN), lipoquitooligosacáridos formados por residuos de β -(1→4) N-acetil-D-glucosamina modificada por distintos sustituyentes químicos en su extremo no reductor (Jones *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2020). Una vez desarrollado el nódulo y diferenciados los bacteroides, una cascada regulatoria sensible al oxígeno es la encargada de controlar la expresión de los genes del complejo de la nitrogenasa y distintas enzimas necesarias para la respiración microaeróbica, requerida para producir la energía para el proceso (Jones *et al.*, 2007). Los genes *nif* codifican principalmente las enzimas del complejo nitrogenasa (NifHDK) y la proteína regulatoria NifA, mientras que los genes *fix* incluyen aquellos que codifican para aceptores terminales de electrones y proteínas regulatorias (Barnett *et al.*, 2006). En *S. meliloti*, el sistema de dos componentes FixL/FixJ es el encargado de coordinar la expresión de genes necesarios para la respiración dentro de los nódulos y la fijación de nitrógeno (Barnett *et al.*, 2006). La acción de estos reguladores, junto con NifA y FixK, es la responsable de la mayor parte de los cambios en la expresión de genes y proteínas durante la diferenciación bacteriana (Jones *et al.*, 2007).

DiCenzo *et al.* (2016) demostraron que sólo tres regiones del plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti* Rmp110 son necesarias para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno. En trabajos recientes se ha buscado el conjunto mínimo de genes simbióticos necesarios para el desarrollo de esta simbiosis eficiente en la fijación, realizando deleciones sucesivas de estas regiones determinadas como esenciales. Geddes *et al.* (2021) describieron un conjunto mínimo de genes que incluían los genes *nod*, *nif* y *fix* de *S. meliloti* Rmp110 que son necesarios para el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno. En este capítulo, en primer lugar, se evaluó la expresión de los genes simbióticos en nódulos eficientes e ineficientes en la FBN. Luego, se expresaron los genes simbióticos de *S. meliloti* en cepas ineficientes, con el objetivo de estudiar si efectivamente estos genes mejoran el fenotipo simbiótico completando una simbiosis fijadora de nitrógeno eficiente.

VI.2. Expresión de genes simbióticos en nódulos eficientes e ineficientes en la FBN

Como se desarrolló en el capítulo IV, el análisis de la expresión de genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011 demostró que hay tanto genes con la misma tendencia de expresión como genes con tendencia opuesta. Esto quiere decir que algunos genes se inducen en nódulos eficientes e ineficientes, mientras que otros se inducen en nódulos eficientes y se reprimen en nódulos ineficientes o viceversa. Dentro del grupo de genes que tienen el mismo comportamiento, se encuentran numerosos genes necesarios para la simbiosis como lo son los genes *nod*, *nif* y *fix*. En la tabla VI.1 se muestran los mencionados genes junto con el promedio de lecturas normalizadas para cada condición y cepa, y los valores de $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ para cada comparación en la bacteria correspondiente. Se utilizó la anotación asignada a los genes de Sm2011 y la identidad a nivel proteico como guía para identificar los genes ortólogos en LPU83. Como se realizó en el capítulo IV, donde se analizó la transcriptómica dual, se utiliza el término “bacteroides de LPU83” para la condición de las bacterias de LPU83 dentro de los nódulos de *M. truncatula* ya sea a 10 o 31 dpi. En cuanto a los genes simbióticos, los genes *nodABC* necesarios para la síntesis de la estructura principal de los FN, se encuentran inducidos en los bacteroides de LPU83 tanto a 10 como a 31 dpi. Sin embargo, en los bacteroides de Sm2011, dicha expresión no es diferencial. Esto ya ha sido descrito para nódulos infectados con *S. meliloti*, donde se observó que los genes *nodAB* se encuentran expresados en las primeras etapas de la simbiosis (Capela *et al.*, 2006). Algunos genes (como *nodFJN* y *noIFGK*), se encuentran únicamente inducidos a tiempos tempranos en los bacteroides de Sm2011, mientras que en bacteroides de LPU83 se mantienen sobreexpresados a 31 dpi. El gen *nodI*, que codifica para un transportador de FN, se encuentra únicamente sobreexpresado en bacteroides de LPU83 a 31 dpi. El único gen con un comportamiento opuesto entre los bacteroides eficientes e ineficientes es *nodM*. Este gen, que codifica para una glucosamina sintasa (Baev *et al.*, 1991, Baev *et al.*, 1992) se expresa en mayor medida en bacterias de Sm2011 en vida libre que en los bacteroides dentro de los nódulos. Lo contrario sucede con LPU83, donde este gen se encuentra inducido en los bacteroides tanto a 10 como a 31 dpi. Estos resultados indicarían que LPU83 continúa produciendo y secretando FN durante la simbiosis.

En cuanto a los genes *fix*, la gran mayoría de los genes analizados se encuentran inducidos dentro de los bacteroides tanto eficientes como ineficientes. Por un lado, la expresión de estos genes en los bacteroides de LPU83 tiende a ser mayor en los bacteroides a 31 dpi que en aquellos a 10 dpi. Por el otro, en los bacteroides de Sm2011

o no hay diferencias en la expresión génica entre 31 y 10 dpi, o, como es el caso de los genes *fixJ*, *fixQ2* y *fixX*, tienen mayor expresión en los bacteroides a 10 dpi. El sistema de dos componentes FixLJ es el encargado de detectar los bajos niveles de oxígeno y desencadenar una cascada de señalización que induce genes necesarios para la respiración celular. En la tabla VI.1, se indica como *fixL* y *fixJ* a los genes teniendo en cuenta la anotación presente en Sm2011, mientras que *fixL** y *fixJ** son los genes anotados como estos en LPU83. Para el caso de *fixLJ*, se observa que *fixL* se encuentra inducida tanto en los bacteroides de Sm2011 como en los de LPU83 a ambos tiempos post inoculación evaluados. Por su parte, la expresión de *fixJ* en los bacteroides de LPU83 disminuye a 31 dpi, y para Sm2011 es significativamente mayor en los bacteroides a 10 dpi que en aquellos a 31 dpi. El sistema de dos componentes *fixLJ** se encuentra únicamente inducido en los bacteroides de LPU83 a 31 dpi. Cabe mencionar que estos genes se encuentran en el plásmido pLPU83c en LPU83, un plásmido accesorio, mientras que los ortólogos en Sm2011 se encuentran en el plásmido simbiótico pSymA, plásmido simbiótico. El hecho que el regulador transcripcional *fixJ* no se encuentra inducido en los bacteroides de Sm2011 sugiere que los niveles basales de expresión de este gen son suficientes para regular la respuesta a los niveles de oxígeno dentro de los nódulos, o que la inducción de este gen sucede en etapas tempranas de la simbiosis.

Llamativamente, al comparar los genes *nif* tanto en bacteroides de LPU83 como en aquellos de Sm2011 contra las bacterias en vida libre, los mismos se encuentran sobreexpresados en los bacteroides. Esto indicaría que a pesar de que la señalización implicada en la detección de oxígeno no parece estar inducida completamente en LPU83, esta es suficiente para expresar los genes involucrados en el complejo de la nitrogenasa. Para Sm2011, la expresión de estos genes es significativamente mayor en los nódulos a 10 dpi al compararlos con aquellos a 31 dpi. Sin embargo, esta tendencia es opuesta en los bacteroides de LPU83, con una expresión mayor a 31 dpi. Si más allá de los valores de *fold change* se observan las lecturas normalizadas, los genes *nif* y *fix* de Sm2011 presentan muchas más lecturas que los de LPU83, sugiriendo diferencias a nivel de la activación transcripcional de dichos genes.

Tabla VI.1. Expresión de genes simbióticos en LPU83 y Sm2011. Para cada gen se indica el promedio de lecturas normalizadas para las réplicas de las tres condiciones ensayadas para cada bacteria. Las condiciones “10 dpi”, “31 dpi” y “VL” corresponden a bacteroides 10 dpi, bacteroides 31 dpi y bacterias en vida libre, respectivamente. Para las comparaciones realizadas, se expresa el \log_2 FoldChange (LFC) para cada una de las bacterias con *adjusted p-value* menor a 0,05. En caso de no ser significativa la diferencia se indica con “-”. Se muestran en color rosa los valores de LFC de aquellos genes que tienen distinta tendencia al comparar LPU83 contra Sm2011. Para las comparaciones “Bacteroides 10 dpi contra vida libre” y “Bacteroides 31 dpi contra vida libre”, valores positivos de LFC indican mayor expresión en los bacteroides dentro de los nódulos que en vida libre, mientras que en la comparación “Bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi” valores positivos indican mayor expresión en la condición de bacteroides 10 dpi, y valores negativos señalan mayor expresión en los bacteroides 10 dpi. Los ortólogos se buscaron de acuerdo con la anotación en Sm2011. Los genes indicados “*fixL**” y “*fixJ**” se refieren a genes anotados en el genoma de LPU83 como *fixLJ* y sus ortólogos en Sm2011, aunque poseen un porcentaje de identidad bajo (25%).

Gen	Promedio de Lecturas normalizadas de Sm2011			Promedio de Lecturas normalizadas de LPU83			Bacteroides 10 dpi contra vida libre		Bacteroides 31 dpi contra vida libre		Bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi	
	10 dpi	31 dpi	VL	10 dpi	31 dpi	VL	Sm2011 LFC	LPU83 LFC	Sm2011 LFC	LPU83 LFC	Sm2011 LFC	LPU83 LFC
<i>nodA</i>	97	136	58	3224	6389	107	-	4,83	-	5,86	-	-
<i>nodB</i>	109	102	64	1703	4357	100	-	4,04	-	5,42	-	-
<i>nodC</i>	275	179	109	2017	3350	107	-	4,17	-	4,93	-	-
<i>nodD2</i>	1174	2422	171	1564	2197	649	2,61	1,24	3,68	1,73	-	-
<i>nodE</i>	742	433	66	343	895	68	3,45	2,31	2,69	3,68	-	-
<i>nodF</i>	710	169	67	755	689	26	3,24	4,77	-	4,67	-	-
<i>nodG</i>	1465	924	123	25	90	5	3,49	2,17	2,86	3,97	-	-
<i>nodH</i>	1831	3500	223	3926	4347	369	2,85	3,34	3,80	3,48	-	-
<i>nodI</i>	153	112	69	795	2314	97	-	3,00	-	4,56	-	-
<i>nodJ</i>	111	21	38	326	789	70	1,44	2,16	-	3,45	-	1,26
<i>nodL</i>	11126	5577	24	362	604	47	8,76	2,89	7,73	3,66	-	-
<i>nodM</i>	294	330	1838	285	620	72	-2,63	1,96	-2,45	3,07	-	-
<i>nodN</i>	149	40	21	134	79	32	2,56	1,91	-	1,21	-	-
<i>nodP1</i>	2656	2131	240	291	388	21	3,35	3,68	3,07	4,14	-	-
<i>nodQ1</i>	1396	2577	195	213	377	40	2,79	2,34	3,68	3,17	-	-
<i>noeA</i>	59691	10610	272	1112	533	112	7,60	3,24	5,04	2,19	-	-
<i>noeB</i>	25486	7166	215	1651	683	197	6,68	2,97	4,80	1,71	-	-
<i>noIF</i>	166	113	48	257	301	60	1,66	2,08	-	2,29	-	-
<i>noIG</i>	668	504	171	499	430	118	1,84	2,05	-	1,83	-	-
<i>fixA</i>	106004	34584	44	3642	21570	204	11,17	4,09	9,55	6,69	-	-
<i>fixB</i>	104230	27898	50	3039	11875	249	10,96	3,55	9,06	5,54	-	1,89
<i>fixC</i>	117586	24226	162	4604	13462	364	9,41	3,57	7,08	5,15	-	1,45
<i>fixG</i>	4917	6697	19	371	2911	11	7,91	4,95	8,34	7,97	-	2,91
<i>fixH</i>	3287	3788	16	128	1301	7	7,56	4,00	7,74	7,43	-	3,21
<i>fixI1</i>	4049	3263	26	261	2697	35	7,23	2,81	6,89	6,22	-	3,29
<i>fixJ</i>	720	262	318	141	315	335	-	-1,19	-	-	-1,38	-
<i>fixJ*</i>	129	70	136	81	182	56	-	-	-	1,66	-	-
<i>fixK</i>	1161	1761	16	851	1122	28	6,09	4,81	6,67	5,26	-	-
<i>fixL</i>	1852	2253	177	585	1429	131	3,32	2,13	3,62	3,42	-	1,27
<i>fixL*</i>	336	185	350	319	585	175	-	-	-	1,72	-	-
<i>fixN1</i>	8839	6556	33	2187	6417	48	8,02	5,44	7,57	7,03	-	1,52
<i>fixO1</i>	3665	2639	23	403	2403	27	7,19	3,81	6,66	6,44	-	2,46
<i>fixP2</i>	16353	10557	25	668	4112	41	9,31	3,97	8,67	6,63	-	2,56
<i>fixQ2</i>	9360	2882	7	173	579	6	10,19	4,79	8,46	6,65	-1,55	1,68
<i>fixS1</i>	1103	955	3	81	245	5	8,32	3,67	8,06	5,43	-	1,55
<i>fixU</i>	45357	40073	102	1738	2497	89	8,71	4,15	8,51	4,72	-	-
<i>fixX</i>	34738	9381	45	3374	5668	144	9,48	4,44	7,55	5,24	-1,68	-
<i>nifA</i>	316336	200855	359	8872	8759	703	9,69	3,60	9,03	3,58	-	-
<i>nifB</i>	134874	81874	281	3661	13108	91	8,84	5,19	8,09	7,10	-	1,72
<i>nifD</i>	298081	56145	207	7612	26829	82	10,40	6,40	7,96	8,29	-2,17	1,70
<i>nifE</i>	120392	30942	104	2157	10647	38	10,10	5,72	8,11	8,08	-1,79	2,19
<i>nifH</i>	289633	80959	33	13616	61472	70	13,02	7,51	11,20	9,73	-1,68	2,08
<i>nifK</i>	156447	23292	127	6296	24117	86	10,16	6,06	7,35	8,06	-2,44	1,81
<i>nifN</i>	12409	2107	148	3418	13112	61	6,31	5,70	3,76	7,70	-2,39	1,83
<i>nifX</i>	31588	4890	41	1636	4760	21	9,46	6,12	6,68	7,74	-2,34	1,45

VI.3. Complementación de LPU83 con genes simbióticos de *S. meliloti*

La diferencia en los niveles de expresión de los genes *nif* y *fix* sugirió una problemática en cuanto a la expresión de los mismos, por lo que se propuso expresar en LPU83 los genes simbióticos de *S. meliloti*. En colaboración con el grupo del Dr. Barney Geddes (Universidad de Dakota del Norte, Estados Unidos), se obtuvieron dos plásmidos replicativos en rizobios que portaban todos los genes de *S. meliloti* Rmp110 identificados como esenciales: pNod, conteniendo los genes *nod*, y pNif, conteniendo los genes *nif* y *fix*, siendo ambos replicativos en rizobios (Figura VI.1). Estos plásmidos fueron intermediarios de las construcciones utilizadas para generar el pSym mínimo de inserción cromosomal diseñado por Geddes *et al.* (2021), el cual posee un conjunto de genes esenciales para una fijación de nitrógeno exitosa con alfalfa. Con el fin de evaluar si el fenotipo simbiótico de LPU83 se veía modificado por la presencia de los plásmidos con los genes *nod*, *nif* y *fix* de *S. meliloti*, se decidió evaluar el fenotipo de esta cepa conteniendo ambos plásmidos pNod y pNif. Estos plásmidos fueron transferidos a la cepa parental de LPU83 y a LPU83 pSym⁻, la cual fue curada del plásmido simbiótico de la cepa, pLPU83b (Nilsson *et al.*, 2020). Se obtuvieron tanto las cepas con los plásmidos individuales como aquellas con ambos, y se corroboró la presencia de los mismos por PCR amplificando genes presentes en los plásmidos y la resistencia a los antibióticos tetraciclina y espectinomicina que cada uno codifica.

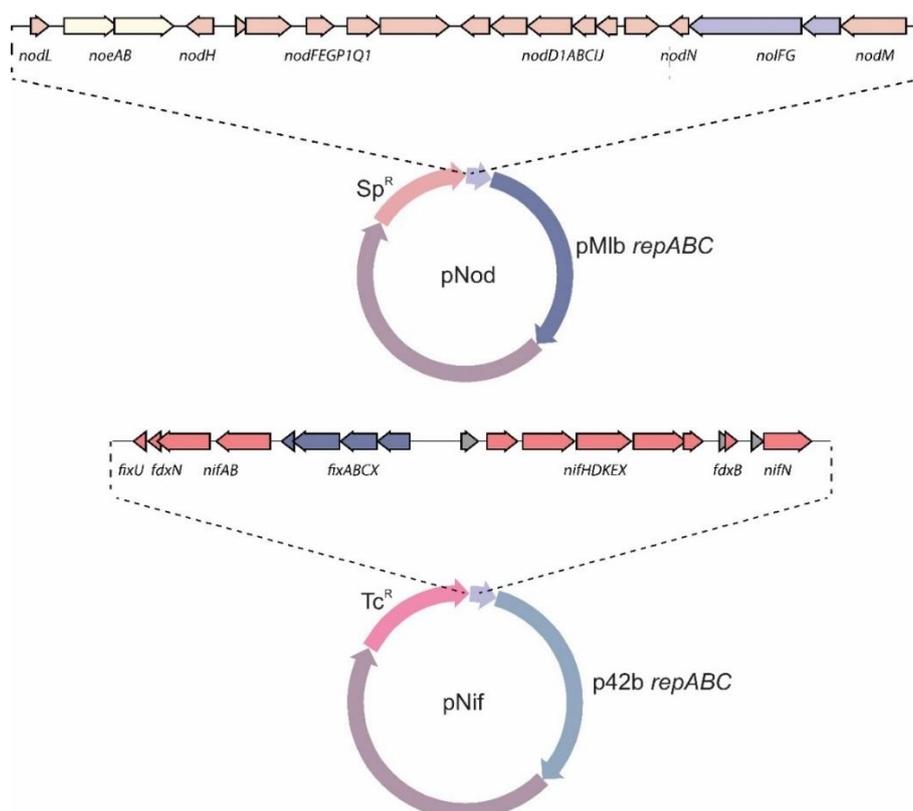


Figura VI.1. Esquema de los plásmidos pNod y pNif utilizados en este trabajo. Se indica en cada plásmido los genes involucrados en simbiosis que codifica cada uno, sus resistencias y su sistema de replicación. “Sp^R” gen de resistencia a espectinomicina, “Tc^R” gen de resistencia a tetraciclina, “pMlb *repABC*” sistema de replicación del plásmido pMlb de *M. loti*, “p42b *repABC*” sistema de replicación del plásmido p42b de *R. etli*.

Una vez corroboradas molecularmente las cepas construidas, se evaluó su fenotipo simbiótico mediante ensayos en planta de *M. truncatula* A17. A los 31 dpi, las plantas inoculadas con las distintas cepas de LPU83 y LPU83 pSym⁻ con los plásmidos portadores de los genes simbióticos no mostraron diferencias en aspecto con aquellas sin inóculo bacteriano. Las hojas poseen una coloración amarilla en contraste con aquellas inoculadas con *S. meliloti* Rmp110, cuyas hojas son verdes y de aspecto sano. Las medidas de peso seco mostraron que, correspondiéndose con lo mencionado, no había diferencias significativas entre las cepas de LPU83 (pNod), LPU83 (pNif) y LPU83 (pNod, pNif) con la cepa parental y el control sin inocular (Figura VI.2.A). Lo mismo sucede con las cepas de LPU83 pSym⁻ portando los distintos plásmidos estudiados, no se detectan diferencias con la cepa parental y el control sin inocular. Todas las variantes ensayadas presentan diferencias significativas con aquellas inoculadas con *S. meliloti* Rmp110 (Figura VI.2.A).

Otro parámetro simbiótico evaluado fue el número de nódulos por planta. Se observó que tras la incorporación de los plásmidos analizados a la cepa parental LPU83, ésta continúa siendo capaz de nodular *M. truncatula* dando lugar a un número similar de nódulos por planta, y sólo aumenta el número de nódulos cuando porta únicamente

el plásmido pNif (Figura VI.2.B). A pesar de no tener diferencias significativas, el número de nódulos por planta es mayor para las cepas de LPU83 que aquellas inoculadas con Rmp110, fenotipo usual para LPU83. Para el caso de las plantas inoculadas con LPU83 pSym⁻ y LPU83 pSym⁻ (pNif), no se observó formación de nódulos en las mismas, fenotipo esperado debido a la ausencia de los genes *nod* en las cepas. LPU83 pSym⁻ (pNod) fue capaz de formar nódulos en *M. truncatula* A17, lo que nos confirma que la expresión en *trans* de los genes *nod* de *S. meliloti* Rmp110 en el entorno genético de LPU83 es suficiente para nodular *M. truncatula*. En cuanto al número de nódulos por planta generados por LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif), este valor disminuye con respecto al observado para las cepas de LPU83. Las plantas noduladas por esta cepa no tienen diferencias con el número de nódulos presentes en las plantas infectadas por Rmp110 (Figura VI.2.B). LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) genera un número significativamente menor de nódulos que LPU83 pSym⁻ (pNod). Esto implica que la expresión de estos genes contenidos en ambos plásmidos en el entorno genético de LPU83 pSym⁻ es suficiente para modificar la cantidad de nódulos que genera en *M. truncatula* A17, a pesar de no alterar los niveles de fijación de nitrógeno.

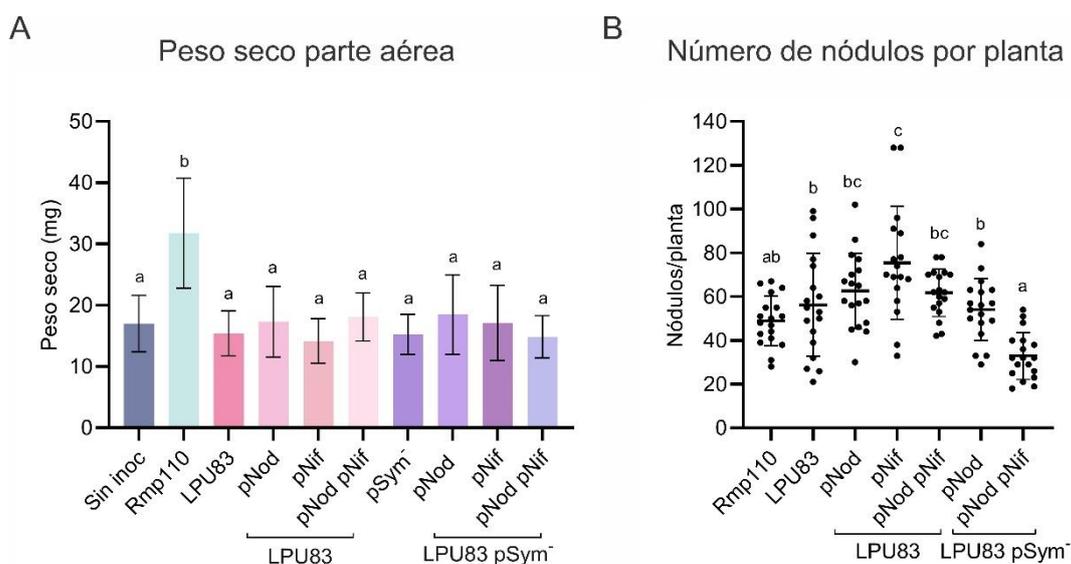


Figura VI.2. Efecto de la presencia de los plásmidos pNod y pNif en el fenotipo simbiótico de LPU83. A. Peso seco de parte aérea por planta para cada uno de los tratamientos. **B.** Número de nódulos por planta. ANOVA con test de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos con *p-value* menor a 0,05. Resultados representativos de tres experimentos independientes con al menos 18 plantas por tratamiento.

VI.4. Estudio de la morfología de los nódulos infectados por cepas portadoras de los plásmidos pNod y pNif

Debido a que no se detectaron diferencias en los niveles de fijación de nitrógeno medidos indirectamente como el peso seco de la parte aérea de las plantas, pero si se observaron diferencias en la cantidad de nódulos generados, se decidió profundizar la caracterización de los nódulos. Para ello se estudió si la presencia de estos plásmidos alteraba el desarrollo interno del nódulo y la morfología de los bacteroides. Luego de 14 días, los nódulos generados por todas las cepas se veían aún pequeños y redondeados, incluso aquellos generados por *S. meliloti* Rmp110. Se procedió a cortar los nódulos en secciones longitudinales y observarlas al microscopio confocal luego de la tinción con yoduro de propidio y Syto9. Como se observa en la figura VI.3.A-C, en los nódulos de *M. truncatula* A17 infectados por *S. meliloti* Rmp110 se distinguen células vegetales llenas de bacteroides y núcleos teñidos con yoduro de propidio. Los bacteroides dentro de los nódulos se ven alargados, indicando diferenciación de los mismos (Figura VI.3.C). Para el caso de los nódulos de LPU83, se observan células vegetales con bacterias, pero al verlas en más detalle, no se ven alargadas sino más bien redondeadas, sin aparente diferenciación (Figura VI.3.D-F), correspondiéndose con el fenotipo ya descrito de la cepa (ver capítulos III y V). Los nódulos infectados por LPU83 (pNod) y LPU83 (pNif) aparentan tener células vegetales con una menor cantidad de bacterias, y aspecto más vacío; los bacteroides también se observaron redondeados como en los nódulos generados por LPU83 (Figura VI.3.G-L). Como se observa en la figura VI.3.M-Ñ, los nódulos de LPU83 portando ambos plásmidos (pNod y pNif) mostraron células vegetales parcialmente ocupadas y con bacterias redondeadas. En los nódulos de LPU83 (pNod) y LPU83 (pNod, pNif) se observan zonas teñidas con yoduro de propidio, tanto las células vegetales como bacteroides, sugiriendo que las células son senescentes. Morfológicamente, los nódulos de LPU83 pSym⁻ (pNod) y LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) son similares: ambos presentan tanto células vegetales como bacteroides teñidos con Syto9 de aspecto redondeado y, también, presentan células vegetales y bacteroides teñidos con yoduro de propidio, indicando también una posible senescencia de los nódulos (Figura VI.3.O-T).

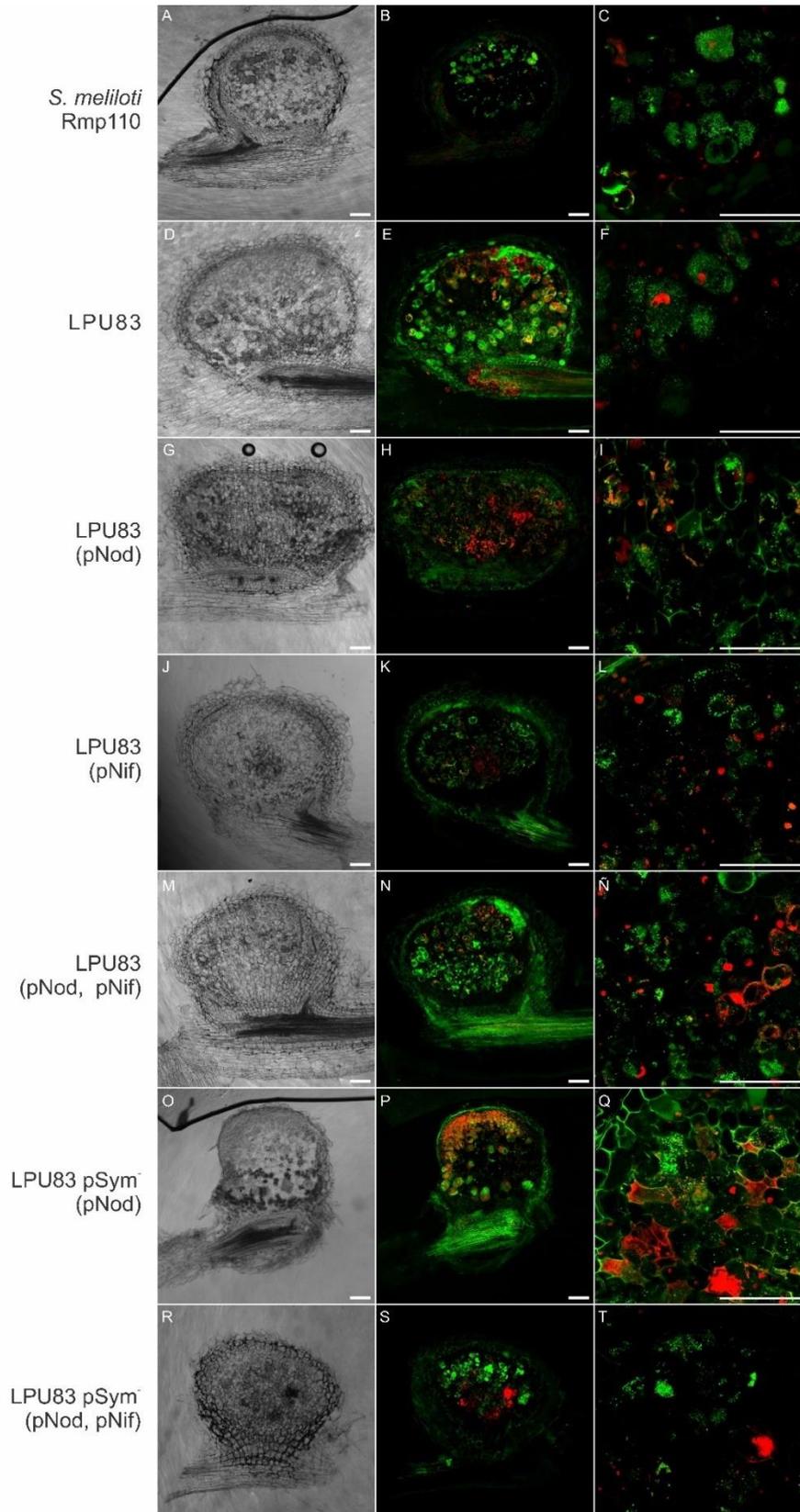


Figura VI.3. Estudio de la morfología de los nódulos de *M. truncatula* a los 14 dpi. Microscopía confocal de cortes longitudinales de nódulos de *M. truncatula* infectados por: *S. meliloti* Rmp110 (A-C), LPU83 (D-F), LPU83 (pNod) (G-I), LPU83 (pNif) (J-L), LPU83 (pNod, pNif) (M-Ñ), LPU83 pSym⁻ (pNod) (O-Q) y LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) (R-T). La escala se indica como una barra blanca en la esquina inferior derecha de cada figura y representa 100 μ m.

Como se mencionó previamente, los nódulos de *M. truncatula* A17 infectados con algunas de las cepas estudiadas, a 14 dpi ya mostraban indicios de senescencia. De esta manera, realizamos observaciones al microscopio confocal de secciones longitudinales de los nódulos a los 31 dpi con el fin de detectar diferencias con los nódulos previamente estudiados. Durante el desarrollo normal de los nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno, en ese tiempo se debería elongar el nódulo y microscópicamente deberíamos observar las distintas zonas dentro del mismo, marcadas por las diferencias fenotípicas de los bacteroides (Vasse *et al.*, 1990, Maunoury *et al.*, 2010). A los 31 dpi, se observaron nódulos infectados por Rmp110 con bacteroides diferenciados: elongados y ocupando por completo las células vegetales del nódulo (Figura VI.4.A-C). En cambio, en las distintas cepas de LPU83 (Figura VI.4.D-F) se observó que las células vegetales no se encuentran completamente ocupadas de bacterias y que, excluyendo la cepa salvaje LPU83, aumenta la proporción de bacteroides teñidos con yoduro de propidio en los nódulos. Esto se observa incluso en los nódulos generados por las cepas LPU83 pSym⁻ (pNod) (Figura VI.4.O-Q) y LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) (Figura VI.4.R-T). Dentro de los nódulos se observan zonas intensamente teñidas con yoduro de propidio, que no aparentan ser bacteroides definidos ni núcleos de células de la planta, sino más bien una estructura por fuera de las células bacterianas.

La tinción con yoduro de propidio y syto9 que se realizó en los cortes de los nódulos sugiere que las cepas que portan los plásmidos estudiados presentan un mayor número de bacterias muertas dentro del nódulo, al tener una mayor proporción de bacterias teñidas con yoduro de propidio. Para determinar si la viabilidad de las bacterias cambiaba, se realizó un recuento de bacterias viables dentro del nódulo. Los recuentos se realizaron en placas con medio TY agarizado suplementado con los antibióticos presentes en los plásmidos (tetraciclina (pNod) y espectinomicina (pNif)) o simplemente con estreptomycin. Los recuentos en TY suplementado con estreptomycin (figura VI.5.A) demostraron que el número total de rizobios que se recuperan de los nódulos de las cepas de LPU83 y LPU83 pSym⁻ portadoras de los plásmidos no tienen diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, se observa que Rmp110 tiene un valor significativamente menor de UFC/mg de nódulo que todas las cepas estudiadas (Figura VI.5.A). Esto se corresponde con el fenotipo fijador de la cepa, ya que las bacterias se diferencian en bacteroides y este proceso de diferenciación lleva a una serie de modificaciones que no le permiten volver a multiplicarse en condiciones de cultivo (Mergaert *et al.*, 2006). Para estudiar la estabilidad de los plásmidos dentro de los bacteroides, se realizaron recuentos en medio suplementado con los antibióticos

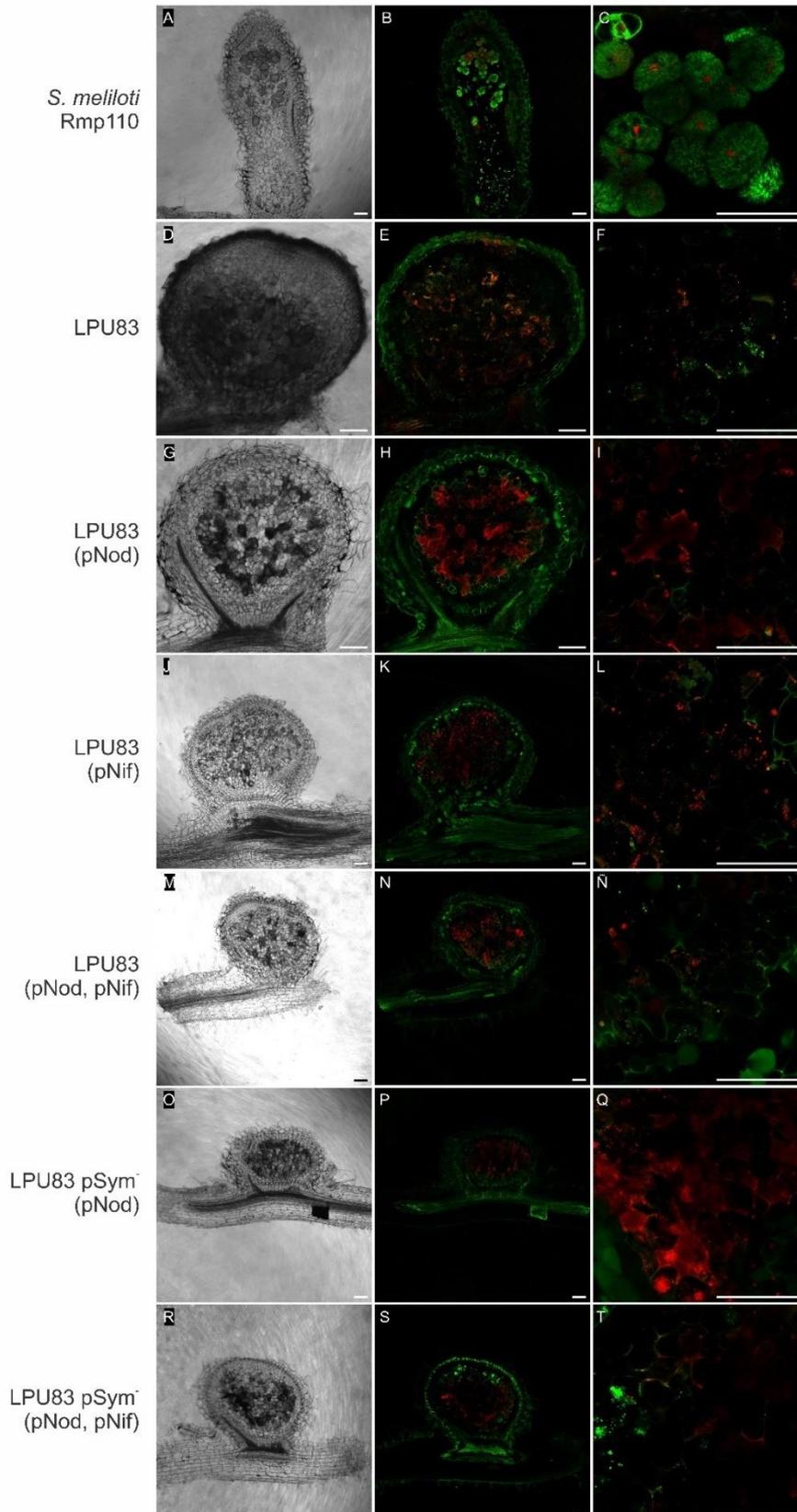


Figura VI.4. Estudio de la morfología de los nódulos de *M. truncatula* a los 31 dpi. Microscopía confocal de cortes longitudinales de nódulos de *M. truncatula* infectados por: *S. meliloti* Rmp110 (A-C), LPU83 (D-F), LPU83 (pNod) (G-I), LPU83 (pNif) (J-L), LPU83 (pNod, pNif) (M-Ñ), LPU83 pSym⁻ (pNod) (O-Q) y LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) (R-T). La escala se indica como una barra blanca en la esquina inferior derecha de cada figura y representa 100 μ m.

tetraciclina y espectinomicina. Se observa que el número de bacterias recuperadas de los nódulos es significativamente menor para aquellas cepas portadoras del plásmido pNif, tanto en LPU83 como en LPU83 pSym⁻, con o sin pNod presente (Figura VI.5.B). Esto sugiere que el plásmido pNif no sería estable en las bacterias dentro de los nódulos. Para el caso de LPU83 (pNod) y LPU83 pSym⁻ (pNod), el número de bacterias viables se mantiene en relación con el obtenido en TY suplementado con estreptomicina, por lo que el plásmido sería estable. Los datos obtenidos sugieren que la presencia de los plásmidos pNod y pNif no mejoran el fenotipo simbiótico de LPU83. Estos plásmidos alteran la morfología interna del nódulo, presentando una mayor proporción de membranas dañadas, teñidas con yoduro de propidio. El número de nódulos generados por LPU83 pSym⁻ (pNod, pNif) fue una de las pocas diferencias que se observaron, siendo dicho valor menor para estas bacterias.

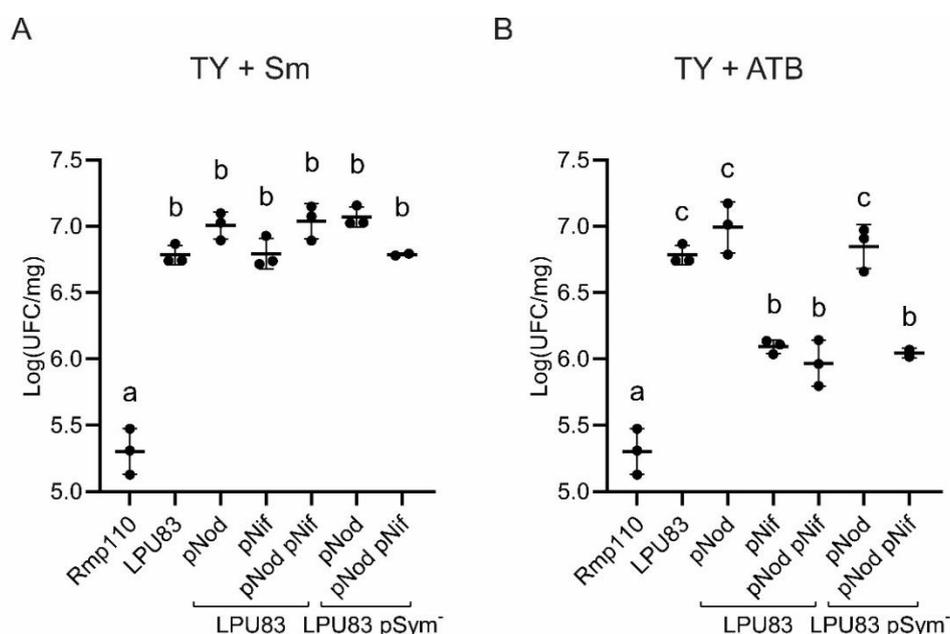


Figura VI.5. Recuento de bacterias viables de nódulos infectados por cepas complementadas. **A.** Recuentos realizados en placas de TY con el antibiótico estreptomicina (Sm). **B.** Recuentos realizados en placas de TY suplementadas con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia presente en el plásmido: tetraciclina (pNod), espectinomicina (pNif) o ambos (pNod, pNif). Para las cepas control (Rmp110 y LPU83) se utilizaron placas suplementadas con estreptomicina. Valores expresados como Log (UFC/mg de nódulo húmedo). ANOVA con test de Tukey, letras distintas indican diferencias significativas con *p*-value menor a 0,05.

VI.5. Complementación con plásmidos pNod y pNif en el entorno de *S. meliloti*

Teniendo en cuenta que la complementación de LPU83 con los plásmidos pNod y pNif no mejoraron el fenotipo simbiótico, se buscó evaluar si la complementación en el entorno genético de *S. meliloti* con estos plásmidos restauraba el fenotipo simbiótico de

la cepa. Para esto se utilizó la cepa *S. meliloti* Sma818R, derivada de *S. meliloti* 2011 que se encuentra curada del plásmido simbiótico pSymA. Se construyeron las cepas Sma818R (pNod), Sma818R (pNif) y Sma818R (pNod, pNif), conteniendo los plásmidos en forma individual o conjunta para evaluar si eran capaces de generar nódulos y realizar una FBN en las condiciones de trabajo ensayadas.

Para evaluar el fenotipo simbiótico de las cepas construidas se realizaron ensayos en *M. truncatula* A17. Luego de 31 días, las plantas inoculadas por Sma818R (pNod) y Sma818R (pNif) se observan pequeñas y sin diferencias con el control sin inocular. Este es un fenotipo esperado ya que las bacterias que sólo portan el plásmido pNod pueden nodular pero no fijar nitrógeno, y aquellas que solo portan el plásmido pNif no pueden generar nódulos. Los nódulos generados por Sma818R (pNod) son blancos, redondos y más pequeños que aquellos generados por *S. meliloti* Rmp110. Sin embargo, las plantas infectadas por Sma818R (pNod, pNif), que poseen tanto los genes *nod* como *nif* y *fix*, no tienen el aspecto sano que tienen aquellas infectadas con el control positivo, *S. meliloti* Rmp110. Los nódulos son blancos, pero poseen una forma más alargada que aquellos infectados por la cepa portando solo el plásmido pNod. Sin embargo, el valor de peso seco es menor que el de las cepas infectadas con el control, Rmp110 (Figura VI.6.A). El número de nódulos por planta mostró ser menor para el caso de Sma818R (pNod) y sin diferencias para Sma818R (pNod, pNif) al compararlo con el control.

Se realizaron cortes longitudinales de los nódulos y fueron visualizados utilizando ioduro de propidio y Syto9. En el microscopio confocal, se observó que los nódulos generados por Rmp110 (Figura VI.6.C. A-D) mostraban células vegetales completamente ocupada por bacteroides alargados, como se observó en las figuras anteriores. En los nódulos generados por Sma818R (pNod) observamos que los bacteroides no se encuentran alargados y que las células vegetales tienen un aspecto más vacío (Figura VI.6.C. E-H). Estos nódulos tienen una gran proporción de bacteroides muertos, teñidos por ioduro de propidio. Los nódulos generados por Sma818R (pNod, pNif) presentaban aspecto alargado, similares a los generados por Rmp110 (Figura VI.C. I-L). Si bien no se observó una gran proporción de bacteroides elongados, tampoco se observó una gran proporción de bacteroides teñidos por ioduro de propidio, demostrando una mayor supervivencia de los mismos al portar ambos plásmidos.

A pesar de que la presencia de los plásmidos en Sma818R no restaura el fenotipo de la cepa salvaje a 31 dpi, observamos que las bacterias son capaces de infectar *M. truncatula* generando nódulos en las raíces de las plantas y que la presencia del plásmido pNif lleva a que los nódulos tengan un aspecto más sano, parecido al de los nódulos fijadores.

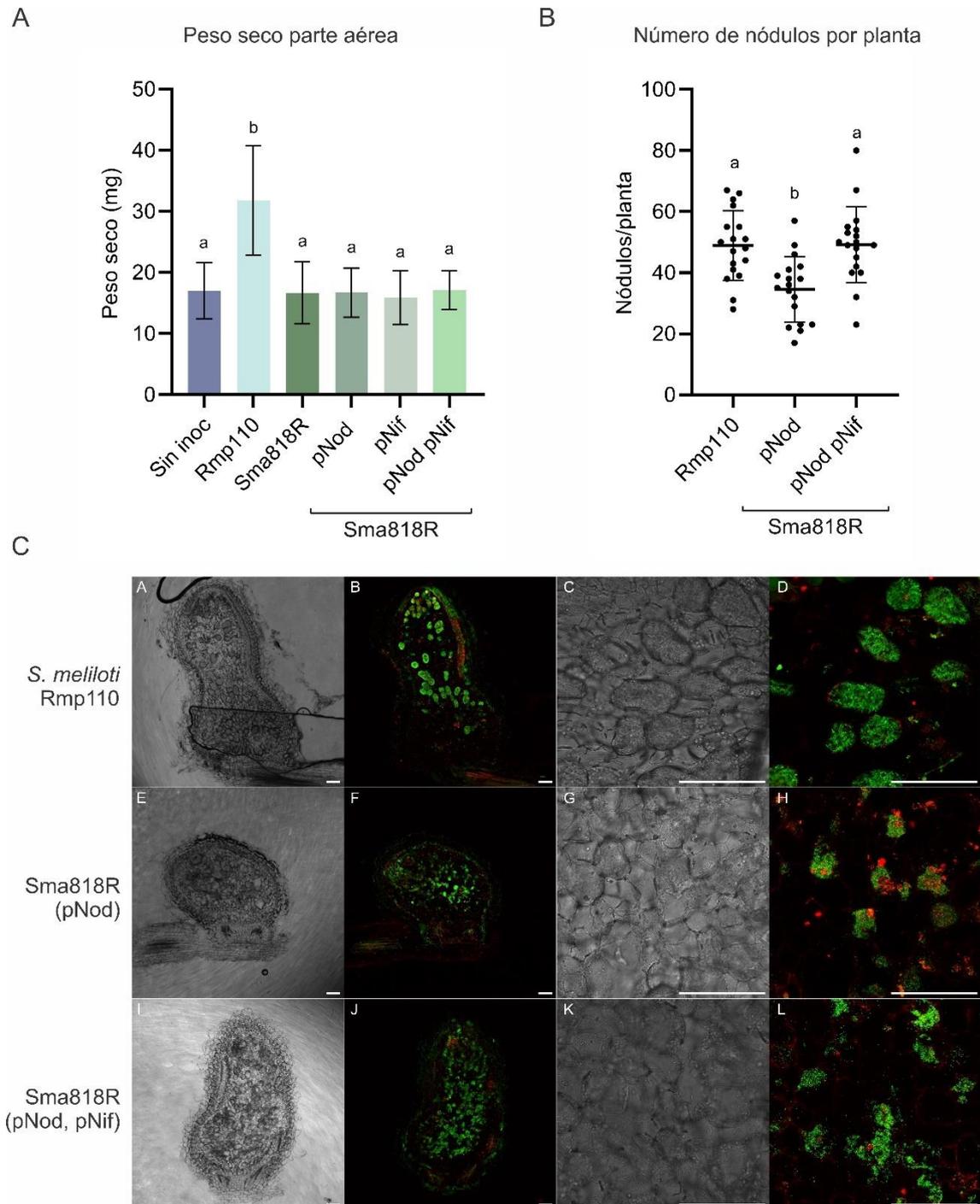


Figura VI.6. *S. meliloti* Sma818R complementada con pNod y/o pNif. A. Peso seco expresado como mg de parte aérea de planta para cada cepa. **B.** Número de nódulos por planta generados por cada cepa. ANOVA con test de Tukey, letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos con *p-value* menor a 0,05. **C.** Secciones de nódulos de *M. truncatula* A17 infectados por las distintas cepas de Sma818R con los plásmidos estudiados. Infectados por: *S. meliloti* Rmp110 (A-D), *S. meliloti* Sma818R (pNod) (E-H) y *S. meliloti* Sma818R (pNod, pNif) (I-L). La primera y tercera columna corresponden al campo claro, y la segunda y cuarta columna a la superposición de los canales para yoduro de propidio (rojo) y Syto9 (verde). La escala se indica como una barra blanca en cada imagen y corresponde a 100 μ m.

VI.6. Conclusiones parciales

Para el desarrollo de una simbiosis fijadora de nitrógeno eficiente, el rizobio que infecta a la planta debe expresar una serie de determinantes simbióticos de manera coordinada con el proceso mismo de infección. En la bacteria modelo *S. meliloti*, se ha logrado encontrar el mínimo número de genes cuya expresión permite la FBN exitosa (*nod*, *nif*, *fix*), situados en su mayoría en el plásmido simbiótico pSymA (diCenzo *et al.*, 2016, Geddes *et al.*, 2020).

Debido a la simbiosis ineficiente que desarrolla *R. favelukesii*, se evaluó en primer lugar, y en base a los resultados transcriptómicos (Capítulo IV), si los genes se estaban expresando dentro de los bacteroides de LPU83. Ortólogos de los genes *nod*, *nif* y *fix* de Sm2011 se expresan en los bacteroides de LPU83, aunque varios de ellos con distintos perfiles que en Sm2011. La expresión de los genes *nod* no decae a medida que crece el nódulo, siendo diferencial tanto a 10 como a 31 dpi. Los genes *fix*, por otro lado, se encuentran inducidos en ambos tipos de nódulos, excepto el regulador transcripcional *fixJ*, cuya expresión disminuye en los bacteroides de LPU83 a 31 dpi. En lo que respecta a los genes *nif*, se expresan tanto en los bacteroides de Sm2011 como en los de LPU83. Esto demuestra que la mayoría de los genes se están expresando en ambos tipos de nódulos, lo que sugiere que la expresión de los genes *fix* y *nif* en particular, no dependería del estado de diferenciación de los bacteroides. El hecho que los genes *nod* continúen expresándose dentro de los bacteroides de LPU83 podría interferir con las posteriores cadenas de señalización que llevan a la FBN y sugiere una infección constante.

Para evaluar si el fenotipo de LPU83 podía cambiar mediante la expresión heteróloga de los genes simbióticos de *S. meliloti* en *R. favelukesii*, se utilizaron plásmidos con genes esenciales para la FBN eficiente (Geddes *et al.*, 2021). Si bien se construyeron diferentes variantes de LPU83 con los plásmidos que portan los genes involucrados en la nodulación y en la fijación de N₂, ninguna de estas variantes fue capaz de lograr una FBN comparable a la de *S. meliloti*. Al analizar la morfología de los nódulos, en la mayoría de los casos se observa un elevado número de bacterias teñidas con yoduro de propidio dentro de los mismos, lo que nos permite suponer una activa reacción de defensa por parte de la planta. Cuando se utilizaron estos plásmidos en Sma818R no se pudo restaurar el fenotipo fijador de la cepa a 31 dpi. Dado que los genes de los plásmidos pNod y pNif provienen de *S. meliloti* pero no son de esta cepa específicamente, el hecho de que no logre fijar nitrógeno efectivamente puede estar relacionado a que esta variante de *S. meliloti* necesite otros genes para interaccionar correctamente con *M. truncatula*. La presencia del plásmido pNod es suficiente para que

Sma818R infecte *M. truncatula*. A pesar de que no parece fijar nitrógeno correctamente, Sma818R (pNod, pNif) genera nódulos más alargados y, aunque sus bacteroides no parecen encontrarse alargados, no se observa gran proporción de células teñidas con yoduro de propidio. No hay diferencias en el número de nódulos generados por esta cepa complementada y la cepa control, lo que sugiere también una regulación del número de nódulos normal. La estabilidad del plásmido pNif podría estar implicada en esta ineficiencia en la fijación.

Estos resultados sugieren que la mera expresión de estos genes en un entorno distinto al de la cepa original no necesariamente van a generar un fenotipo eficiente en la cepa de destino. Otros determinantes parecen también ser necesarios para lograr una eficiente FBN.

Capítulo VII:
**Expresión de NCRs en nódulos eficientes
e ineficientes y rol de peptidasas
bacterianas que los degradan**



VII.1. Introducción

En los nódulos indeterminados las bacterias sufren una diferenciación terminal en bacteroides, un estado irreversible que implica que las bacterias no pueden volver a la vida saprofitica una vez finalizado el proceso simbiótico. Como se ha mencionado, este es el caso de *Medicago truncatula* como también de otras especies donde el proceso de diferenciación es controlado por péptidos ricos en cisteína específicos de nódulos (NCRs por *nodule specific cystein-rich peptides*) (Mergaert *et al.*, 2006). Estos péptidos son secretados por las células vegetales del nódulo infectadas por rizobios e inducen la diferenciación de las bacterias en bacteroides dentro de las mismas, mediante distintos procesos moleculares (Van de Velde *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el NCR247 forma complejos con distintas proteínas bacterianas alterando su división celular, proteoma y fisiología dentro del nódulo (Farkas *et al.*, 2014). Los NCRs son traslocados al citosol bacteriano y allí pueden ser degradados por peptidasas bacterianas, como una respuesta de defensa a la actividad antimicrobiana de estos péptidos (Ghosh & Chakraborty, 2024). Recientemente, se han descrito dos peptidasas involucradas en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno: HrrP y SapA (Price *et al.*, 2015, Benedict *et al.*, 2021). La expresión de *hrrP* (*host range restriction peptidase*) en *S. meliloti* B800 inhibe la fijación de nitrógeno en plantas de *Medicago truncatula* A20, pero no así en A17 (Price *et al.*, 2015). Se ha demostrado que esta peptidasa es capaz de degradar NCRs *in vitro* y que una mutación en su sitio catalítico no le permite llevar a cabo esta acción. Por otro lado, la sobreexpresión de la peptidasa SapA (*symbiosis associated peptidase A*) dentro de los nódulos de *M. truncatula* A20 deriva en plantas con niveles menores de fijación de nitrógeno. A su vez, esta proteína también posee actividad peptidasa contra los NCRs estudiados (Benedict *et al.*, 2021). Fusiones de los promotores de estas peptidasas a la proteína β -glucuronidasa demostraron actividad de ambos promotores dentro de los nódulos de *M. truncatula* A20, pero no así en las bacterias en vida libre, demostrando así la especificidad de tejido de estos promotores (Price *et al.*, 2015, Benedict *et al.*, 2021).

HrrP pertenece a la familia de las M16A zinc-metalopeptidasas caracterizadas por la presencia de un dominio conservado HXXEH acoplado a Zn^{+2} (Becker & Roth, 1992). La estructura de esta proteína monomérica estaría dada por la fusión de dos dominios conectados por un *linker*. El tamaño y la carga del sustrato sería más importante que la secuencia de los péptidos para esta familia de proteínas (Shen *et al.*, 2006). El tamaño de los NCRs maduros (30-60 aminoácidos) se encuentra dentro del rango de tamaños de los péptidos procesados por estas enzimas (30-70 aminoácidos) (Price *et al.*, 2015). En cambio, SapA ha sido predicha como una proteína perteneciente a la familia de M16B

zinc-metalopeptidasas, las cuales tienen una organización homodimérica que forma una estructura tipo *clamshell* (Benedict *et al.*, 2021, Ghosh & Chakraborty, 2024). A su vez, el modelo estructural de SapA muestra que tiene una estructura de hoja β en su extremo N-terminal que implica que esta proteína se pliega en forma globular. Esto prevendría su movimiento hacia el espacio extracitoplasmático (Benedict *et al.*, 2021).

La importancia de los NCRs en la diferenciación bacteriana y que en los nódulos ineficientes de LPU83 este proceso falle, sugiere que la expresión de dichos genes podría estar alterada en los nódulos. Por lo tanto, en este capítulo se analiza en primera medida la expresión de genes que codifican para NCRs en nódulos eficientes e ineficientes en la FBN. Luego, debido al rol negativo de las mencionadas peptidasas bacterianas en la simbiosis y el fenotipo simbiótico ineficiente de LPU83, se propuso identificar y analizar el rol de genes homólogos a las peptidasas HrrP y SapA en *R. favelukesii* LPU83 durante la simbiosis con *M. truncatula*, con el fin de evaluar su implicancia en el fenotipo ineficiente en la fijación biológica de nitrógeno de este rizobio.

VII.2. Expresión de NCRs en nódulos eficientes e ineficientes

Como ya se mencionó previamente, los NCRs son esenciales para la diferenciación bacteriana y son uno de los determinantes de la planta que dirigen este proceso (Mergaert *et al.*, 2006). Durante el análisis de la transcriptómica dual, se identificó una categoría funcional denominada “unión a iones metálicos” que se encontraba enriquecida en los nódulos eficientes en la FBN al compararlos contra los nódulos ineficientes, tanto a 10 como a 31 dpi. Dentro de esta categoría se encontraron genes que codifican para NCRs. Debido a su importancia y al hecho que se expresan diferencialmente en nódulos eficientes, se decidió analizar particularmente la expresión de estos genes en ambos tipos de nódulos.

De los 691 genes identificados como NCRs presentes en la anotación del genoma de *M. truncatula* V5.0 r1.8, 682 fueron detectados en los ensayos transcriptómicos realizados. Se realizó un *heatmap* con las lecturas normalizadas de estos genes, independientemente de la expresión diferencial o no de cada uno de los NCRs, (Figura VII.1) y un agrupamiento jerárquico de acuerdo con los niveles de expresión de los mismos. A su vez, dada la relevancia de estos genes, se incluyeron los resultados de la secuenciación de ARN de los nódulos ineficientes al inocular con la cepa Sma818B. En la figura VII.1 se muestra el gráfico generado, donde la normalización realizada por gen (fila) le otorga color rojo cuando el número de lecturas es alto y azul cuando el número es bajo, de acuerdo a los valores de los 6 tratamientos. En este análisis se determinaron 4 *clusters* (grupos) con distintos perfiles para las condiciones tratadas. El *cluster* 4 es aquel que parece tener el fenotipo más marcado. Se observa que hay una clara

tendencia a que estos genes se encuentren más expresados a 10 dpi y menos expresados a 31 dpi, independientemente del rizobio que infecta el nódulo y, por ende, del tipo de desarrollo del nódulo. Los *clusters* 1, 2 y 3 se agrupan entre sí, con un comportamiento diferente al *cluster* 4 y dependiente de las cepas utilizadas. El *cluster* 1 se separa de los *clusters* 2 y 3 principalmente por las diferencias observadas en la expresión en nódulos de Sm2011, donde el *cluster* 1 presenta más expresión a 31 dpi mientras que los *clusters* 2 y 3 presentan menor expresión al mismo tiempo. El grupo de NCRs que conforman los *clusters* 2 y 3 presentan un comportamiento contrapuesto: más expresión a 10 dpi que a 31 dpi. A continuación, se hace un análisis comparativo de cada *cluster* obtenido en su aspecto temporal y entre cepas eficientes/ineficientes en base a los datos de expresión diferencial obtenidos en el capítulo IV.

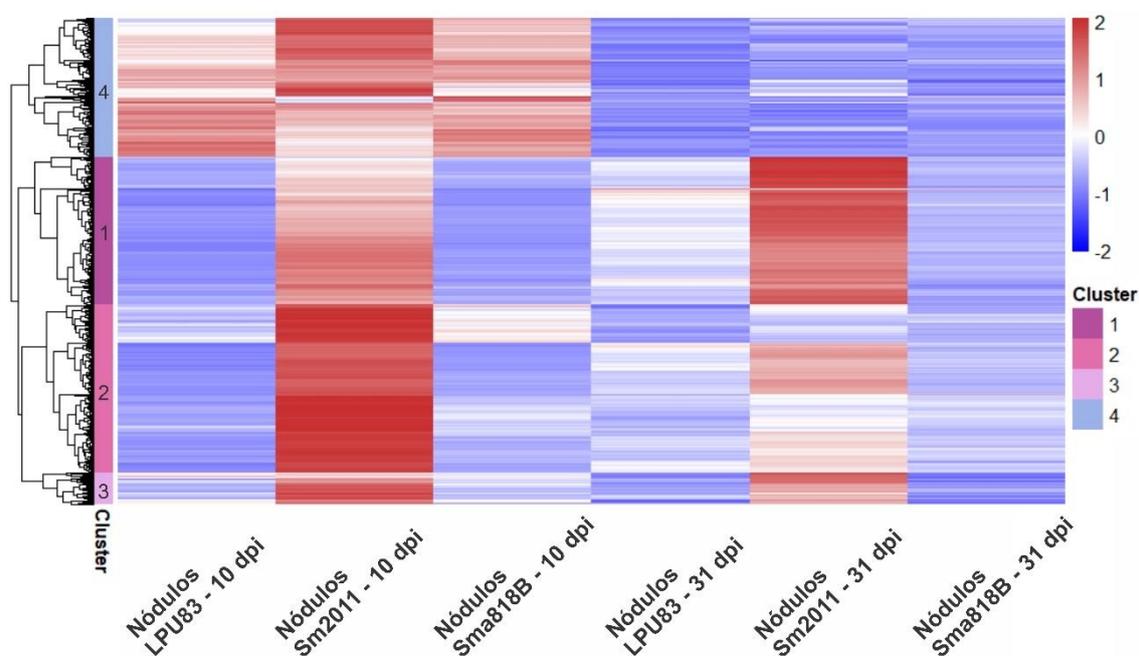


Figura VII.1. Expresión de NCRs en nódulos eficientes e ineficientes. Heatmap de lecturas normalizadas de los 682 genes detectados en la transcriptómica dual realizada. Valor promedio de las tres replicas realizadas para cada condición. La escala de color (rojo a azul) corresponde a la normalización por fila de cada gen, donde rojo indica una mayor cantidad de lecturas con relación a los valores de las otras condiciones y azul una menor cantidad.

Cluster 1

En el *cluster* 1, se observa que hay una mayor expresión de los NCRs en los nódulos eficientes que en aquellos infectados por cepas ineficientes. De los 208 genes presentes en este *cluster*, a 10 dpi el 80% de estos se expresa diferencialmente más en los nódulos eficientes que en los ineficientes. Llamativamente, no hay genes diferenciales al comparar entre las cepas ineficientes, nódulos de LPU83 contra aquellos de Sma818B. Un 18% de los NCRs del *cluster* 1 se expresa más en los nódulos de Sm2011 que de LPU83 a 31 dpi; sin embargo, esta diferencia es aún mayor entre los

nódulos de Sm2011 y aquellos generados por Sma818B (80% de los genes de este *cluster* expresándose más en los nódulos de Sm2011) (Tabla VII.1).

La expresión de estos NCRs en nódulos infectados por Sm2011 no varía significativamente a medida que se desarrolla el nódulo, por lo que la expresión de estos sería constante. Sin embargo, para los nódulos infectados por LPU83 la expresión de una gran cantidad de genes (140) es significativamente mayor a 31 dpi al compararla contra los nódulos generados por la misma cepa a 10 dpi. La misma tendencia se observa con Sma818B, aunque con una menor cantidad de genes diferencialmente expresados (13 GEDs, genes expresados diferencialmente) (Tabla VII.1).

Cluster 2

El *cluster 2* posee 235 genes, de los cuales 185 y 136 poseen una expresión significativamente mayor en nódulos de Sm2011 a 10 dpi al compararlos con aquellos de nódulos de LPU83 y Sma818B, respectivamente (Tabla VII.1). Como se observó en el *cluster 1*, hay una menor cantidad de GED a 31 dpi, mostrando que la mayor diferencia observada en este *cluster* entre nódulos eficientes e ineficientes ocurre a 10 dpi.

En contraste con lo visto en el *cluster 1*, hay 18 genes presentes en los nódulos de Sm2011 que disminuyen significativamente su expresión a 31 dpi con respecto a los nódulos infectados por la misma cepa a 10 dpi. Por el contrario, en los nódulos de LPU83 se detectaron 80 genes cuya expresión era significativamente mayor a 31 dpi que a 10 dpi, opuesto a lo que sucede con la cepa eficiente en la fijación (Tabla VII.1). Es decir, al analizar en este *cluster* la expresión de genes entre nódulos del mismo tipo a distintos tiempos, se observa que los nódulos eficientes disminuyen su expresión a 31 dpi y los nódulos ineficientes aumentan su expresión a 31 dpi. Cabe recalcar, que esto no implica una mayor expresión en la cepa ineficiente que en la eficiente, sino que al comparar la misma cepa en dos tiempos post inoculación, este valor cambia.

Cluster 3

El *cluster 3* es el que posee una menor cantidad de genes, sólo 45, y la menor cantidad de genes diferenciales entre las cepas y tiempos estudiados. Pocos genes se encuentran diferencialmente expresados entre nódulos eficientes e ineficientes: a 10 dpi 6 y 4 genes se expresan significativamente más en nódulos de Sm2011 que en aquellos de LPU83 y Sma818B, respectivamente, mientras que a 31 dpi se detectaron 6 y 8 GEDs, respectivamente (Tabla VII.1).

En este grupo no existen tantas diferencias en la expresión de los NCRs al comparar nódulos infectados por la misma cepa a 10 contra 31 dpi. Solamente es diferencial un NCR en la comparación de Sma818B entre dichos tiempos (Tabla VII.1). Por lo tanto, la expresión no variaría dentro del nódulo en los tiempos estudiados.

Cluster 4

Al analizar los NCRs que agrupan en el *cluster* 4 mediante el análisis estadístico realizado previamente (DESeq2), a 10 dpi se determinó un único GED con mayor expresión en nódulos de Sm2011 que en nódulos de Sma818B, mientras que no se encontraron GEDs al comparar Sm2011 contra LPU83 y Sma818B contra LPU83 (ambas a 10 dpi). A 31 dpi no hay diferencias significativas en la expresión de los NCRs del *cluster* 4 en ninguna de las 3 comparaciones (Sm2011 contra LPU83, LPU83 contra Sma818B y Sm2011 contra Sma818B). La falta de genes diferencialmente expresados en esta comparación nos sugeriría que los NCRs del *cluster* 4 no juegan un rol clave en la diferenciación de las bacterias dentro del nódulo.

De los 194 genes presentes en el *cluster* 4, de 36 a 55 genes se expresan significativamente más a 10 dpi que a 31 dpi en los nódulos infectados con las tres cepas bacterianas, sugiriendo que dentro de este grupo de NCRs hay aproximadamente entre un 72% y 82% de genes que no poseen grandes cambios en su expresión durante el desarrollo del nódulo.

Tabla VII.1. NCRs expresados diferencialmente en cada *cluster*. Se indica el número de GEDs para cada comparación y tiempo. Se incluyen los genes con *adjusted p-value* menor a 0,05 obtenidos del análisis de genes diferenciales realizado con DESeq2.

		Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Nódulos LPU83 contra nódulos Sm2011	10 dpi	175	185	6	0
	31 dpi	38	3	6	0
Nódulos Sma818B contra nódulos Sm2011	10 dpi	172	136	4	1
	31 dpi	168	13	8	0
Nódulos LPU83 contra nódulos Sma818B	10 dpi	0	4	0	0
	31 dpi	5	0	0	0
Nódulos 31 dpi contra nódulos 10 dpi	Sm2011	0	18	0	55
	LPU83	140	80	0	55
	Sma818B	13	1	2	36

Todos los genes que codifican para NCRs encontrados diferencialmente expresados al comparar nódulos eficientes contra ineficientes en la fijación de nitrógeno mostraron una mayor expresión en los nódulos eficientes, independientemente del tiempo post inoculación o la cepa ineficiente utilizada. Sin embargo, se encontró un grupo de genes de NCRs que, a 10 dpi, no tiene diferencias entre nódulos eficientes e ineficientes, lo que demostraría que, a tiempos cortos, la planta intentaría iniciar un proceso de diferenciación en los bacteroides independientemente del rizobio que se encuentre dentro del nódulo. No se puede descartar la posibilidad de que estos genes desempeñen una función adicional, además de promover la diferenciación bacteriana, involucrada en un proceso más general del desarrollo del nódulo, y por eso se expresan

de igual manera en los nódulos ineficientes. El *cluster 4* es aquel que presenta un comportamiento similar entre nódulos eficientes e ineficientes: los NCRs tienen mayor expresión a 10 dpi y esta disminuye a 31 dpi, en los dos tipos de nódulos. Esto sugiere que dichos NCRs no serían esenciales para la diferenciación de los bacteroides, o que cumplen roles necesarios en etapas muy tempranas del desarrollo de los mismos que no se ven afectadas todavía por la falla presente en los nódulos ineficientes.

Actualmente, varios análisis han sido realizados para evaluar cómo actúan los NCRs en los nódulos y detectar aquellos que son esenciales para el desarrollo de una simbiosis fijadora de nitrógeno:

-Saifi *et al.* (2024) describieron recientemente otros NCRs involucrados en fenotipos *fix* de mutantes en *M. truncatula*. El NCR086 se expresa en la zona I y zona III de los nódulos y es necesario para la correcta diferenciación de los bacteroides. Este NCR, a 10 dpi, parece no encontrarse inducido en los nódulos ineficientes de LPU83, con valores de lecturas normalizadas cercanas a 2500, mientras que en los nódulos de Sm2011 las lecturas llegan a valores cercanos a 18500 (Tabla VII.2), indicando una clara sobreexpresión de este gen en nódulos eficientes en la FBN.

-El péptido NCR169 se encuentra entre los más estudiados y ha sido descrito como necesario para la diferenciación (Horvath *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2023). En los resultados obtenidos en esta tesis, dicho péptido se expresa en mayor medida en nódulos de Sm2011 al compararlo con aquellos de LPU83 a 10 dpi. A su vez, este NCR aumenta su expresión en los nódulos de LPU83 a 31 dpi al compararlo con aquellos a 10 dpi. Sin embargo, al analizar las lecturas normalizadas para el NCR169, siempre se observa que los nódulos de Sm2011 tienen más lecturas normalizadas que los nódulos infectados por LPU83 (Tabla VII.2). Los valores de lecturas normalizadas muestran que, a pesar de que este aumento es significativo, los valores de lecturas obtenidas no son del orden de aquellas obtenidas en los nódulos de Sm2011 (Tabla VII.2).

-Llamativamente, el NCR247 que interactúa en las células donde la división celular bacteriana se encuentra detenida (Farkas *et al.*, 2014) no presenta diferencias significativas entre nódulos eficientes e ineficientes en la FBN, con valores similares en las lecturas normalizadas (Tabla VII.2); este gen se encuentra en el *cluster 4*, con una mayor expresión a 10 dpi.

-El NCR343, también descrito como involucrado en la diferenciación y/o mantenimiento de los bacteroides (Zhang *et al.*, 2023), se encuentra diferencialmente expresado en los nódulos eficientes con respecto a los ineficientes a 10 dpi (Tabla VII.2). NCR343 pertenece al *cluster 2* y presenta un comportamiento similar al NCR169.

-El NCR-new35 fue descrito como involucrado en la simbiosis, aunque con valores de expresión menores que otros NCRs como NCR168 y NCR343 (Horvath *et*

al., 2023). Este NCR también pertenece al *cluster 2* y se encuentra sobreexpresado a 10 dpi en nódulos de Sm2011 al compararlos con aquellos de LPU83 (Tabla VII.2).

Resulta llamativo que la mayoría de los NCRs cuya caracterización se ha realizado en mayor profundidad pertenecen al *cluster 2*. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que las diferencias parecen centrarse en estadios jóvenes, donde la inducción de los NCRs en nódulos eficientes es mucho mayor que en los ineficientes, a pesar de que en estos nódulos existe expresión de los mismos. Los NCRs estudiados presentan el mismo patrón de expresión a lo demostrado por Roux *et al.* (2014), quienes al analizar la expresión temporal en nódulos de Sm2011 localizaron la mayor expresión de NCR086, NCR169, NCR343 y NCR-new35 en la interzona. Esto podría relacionarse al hecho de que exista un conjunto de NCRs necesarios para la correcta diferenciación en dicha etapa (Pan & Wang, 2017, Roy *et al.*, 2020), los cuales no estarían tan expresados en los nódulos ineficientes de LPU83.

Tabla VII.2. Lecturas normalizadas de NCRs en nódulos de Sm2011 y LPU83. Se indica el valor de lecturas normalizadas para nódulos de 10 o 31 dpi infectados con LPU83 o Sm2011 y el valor de $\log_2\text{FoldChange}$ al comparar nódulos de LPU83 contra Sm2011. Si la diferencia no es significativa se indica con “-”. Valores negativos indican mayor expresión en nódulos de Sm2011. A su vez, se indica en que *cluster* se encuentra cada NCR en el gráfico de la figura VII.1.

NCR	Cluster	Nódulos 10 dpi			Nódulos 31 dpi		
		LPU83	Sm2011	LFC	LPU83	Sm2011	LFC
NCR086	2	2541	18531	-2,75	4661	6475	-
NCR169	2	3415	72984	-4,20	18680	59196	-
NCR247	4	10304	12404	-	5624	9286	-
NCR343	2	1145	17083	-3,77	8075	12370	-
NCR-new35	2	1799	10906	-2,52	2672	3782	-

VII.3. Búsqueda de proteínas homólogas a Hrrp y SapA en LPU83

Como se describió en la sección anterior, los péptidos NCRs detectados en la transcriptómica dual se expresan más en nódulos eficientes que en los ineficientes. Han sido descritas peptidasas bacterianas involucradas en el metabolismo de los NCRs, las cuales podrían estar relacionadas con el fenotipo ineficiente de LPU83 y ser un determinante en su incapacidad de fijar nitrógeno correctamente. HrrP y SapA son peptidasas descritas como involucradas en la simbiosis fijadora de nitrógeno mediante su clivaje de los NCRs. Su expresión y sobreexpresión dentro de los nódulos de *M. truncatula* A20 generan nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno. Con el objetivo de evaluar si el fenotipo ineficiente en la FBN de LPU83 se encontraba relacionado a la presencia de peptidasas en su genoma, en primer lugar, se buscaron genes homólogos a *hrrP* y *sapA* en dicha cepa. Para ello, se realizó un NCBI Blast sobre la proteína HrrP de *S. meliloti* B800, encontrando una proteína homóloga de 532 aminoácidos en el

plásmido simbiótico de LPU83 con un porcentaje de identidad del 26,55% (LPU83_pLPU83b_0539) y una cobertura del 41%. Esta proteína presenta dos dominios: el M16, que presenta la actividad proteasa con dos sitios de acción predichos en los glutamatos de las posiciones 154 y 224, y el M16C, el cual no tiene actividad peptidasa y su función es estructural. A pesar de que en la búsqueda inicial solo se encontró un homólogo a HrrP en LPU83, al analizar la región genómica donde se encuentra el gen LPU83_pLPU83b_0539, se observó que río abajo se encuentra el gen LPU83_pLPU83b_0540, el cual también codifica para una posible peptidasa (Figura VII.2.A). LPU83_pLPU83b_0540 codifica para una proteína de 438 aminoácidos y posee 22,78% de identidad con HrrP con una cobertura del 19%. Ésta no posee el dominio M16 proteasa, pero sí un péptido señal en su extremo N-terminal y un dominio M16C sin actividad proteasa en su extremo C-terminal (Figura VII.1.A). Al analizar el tándem LPU83_pLPU83b_0539 - LPU83_pLPU83b_0540, los dominios resultantes serían el dominio M16 proteasa seguido de dos dominios M16C estructurales, por lo que la organización de los dominios del tándem sería similar a los dominios de HrrP.

Para el caso de la proteína SapA de *S. meliloti* 1021, se encontró una proteína homóloga en el cromosoma de LPU83 (LPU83_1075) de 433 aminoácidos con un porcentaje de identidad del 87,78% y cobertura del 98%. Como en el caso de la proteína presente en *S. meliloti* 1021, presenta dos dominios: un dominio peptidasa M16 y un dominio M16C sin actividad catalítica (Figura VII.2.B).

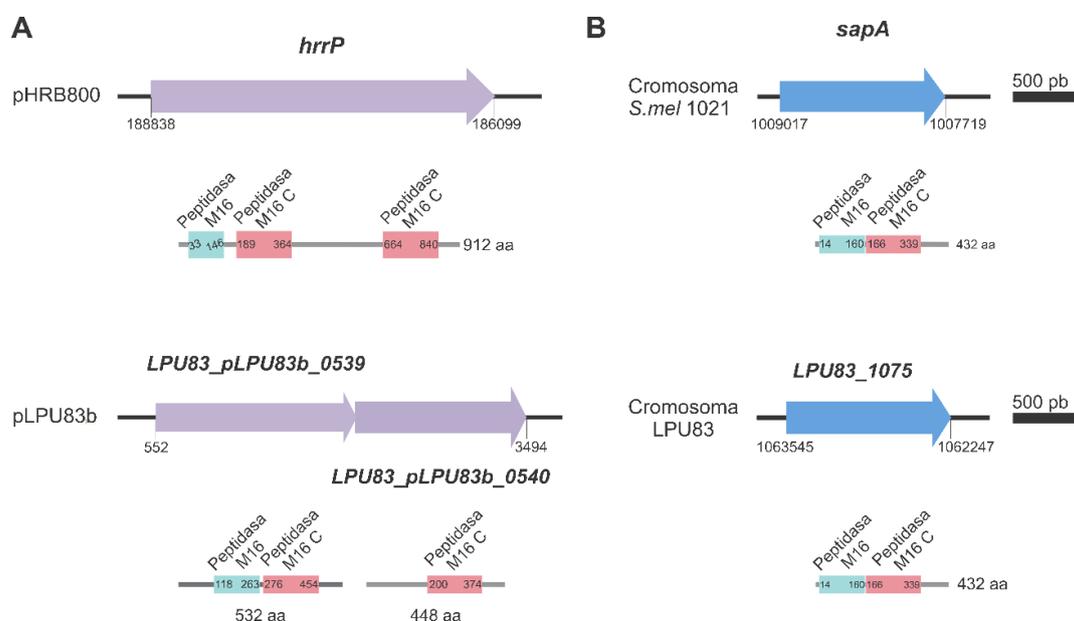


Figura VII.2. Estructura genética y dominios de las peptidasas presentes en *S. meliloti* y en LPU83.

A. HrrP. **B.** SapA. Los números presentes al inicio y final de cada gen indican la posición en la molécula de ADN de la cepa correspondiente. Para cada gen se muestra debajo un esquema de los dominios presentes en las proteínas, indicados en números los aminoácidos donde inicia y termina el dominio, y al final se encuentra indicado el total de aminoácidos ("aa") presentes en la proteína. El fragmento del genoma indicado como pLPU83b corresponde al *contig* 53 del plásmido simbiótico (Número de acceso CBYB000000053).

VII.4. Análisis de la expresión transcripcional de los genes que codifican para las posibles peptidasas

Utilizando los resultados de la secuenciación masiva de ARN mostrados en el capítulo IV, se analizó la expresión de estos genes dentro de los nódulos de *M. truncatula* A17. Se observa que para el caso del gen LPU83_1075, no hay diferencias en su expresión en las bacterias de LPU83 en vida libre comparando con los bacteroides tanto a 10 como a 31 dpi (Tabla VII.3). Analizando las lecturas normalizadas de este gen, vemos que se expresa en vida libre y ligeramente menos dentro del nódulo, sin ser estadísticamente significativa la diferencia (Tabla VII.4). En cambio, los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 se encuentran sobreexpresados dentro de los bacteroides en ambos tiempos post inoculación estudiados (Tabla VII.3). Los valores de lecturas normalizadas sugieren que LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 se expresarían exclusivamente dentro del nódulo, ya que el número de lecturas en vida libre es muy bajo (Tabla VII.4).

El hecho de que los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 se encuentren en tándem y su expresión sea similar, sugiere que estos se expresarían como un operón. Utilizando los transcriptomas de LPU83 en vida libre y dentro del nódulo, se realizó una búsqueda de operones y sitios de inicio de la transcripción utilizando el programa ReadExplorer. Según estos resultados, LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 forman un operón y el análisis realizado solo identificó un posible sitio de inicio de la transcripción río arriba del gen LPU83_pLPU83b_0539. Este sitio se encuentra en la posición 530 de la hebra *forward* del contig CBYB01000053 donde se encuentra el gen. De esta manera, estos genes se estarían expresando dentro del nódulo como un operón.

Tabla VII.3. Expresión de peptidasas en LPU83. Valores de $\log_2\text{FoldChange}$ de las peptidasas de LPU83 al comparar bacteroides a 10 y 31 dpi contra las bacterias en vida libre. Valores de $\log_2\text{FoldChange}$ positivos indican sobreexpresión en los bacteroides (a 10 o a 31 dpi) y valores negativos disminución de la expresión en bacteroides. Se muestran los valores de $\log_2\text{FoldChange}$ para los casos donde el *adjusted p-value* es menor a 0,05 y, por ende, la diferencia es significativa.

Locus tag	$\log_2\text{Fold Change}$	
	Bacteroides 10 dpi	Bacteroides 31 dpi
LPU83_pLPU83b_0539	7,05	7,58
LPU83_pLPU83b_0540	5,25	5,71
LPU83_1075	-	-

Tabla VII.4. Valor de las lecturas normalizadas para las peptidasas presentes en LPU83. Valor promedio de las tres réplicas de las condiciones estudiadas para cada uno de los genes.

Locus tag	Promedio de lecturas normalizadas		
	Vida libre	Bacteroides 10 dpi	Bacteroides 31 dpi
LPU83_pLPU83b_0539	34,0	4971,0	6796,4
LPU83_pLPU83b_0540	80,2	3309,2	4383,5
LPU83_1075	2652,7	1659,3	1638,3

VII.5. Caracterización de los mutantes en las peptidasas en *R. favelukesii* LPU83

Considerando que las peptidasas presentes en el genoma de LPU83 se expresan dentro de los nódulos infectados por esta cepa, se decidió evaluar si la mutación de estos genes altera el fenotipo simbiótico de la cepa. Para llevar a cabo esto, se realizaron tres mutantes en LPU83: en los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 (denominado $\Delta 0539::\Omega Gm$), LPU83_1075 (llamado $\Delta 1075$) y un doble mutante en ambos genes (denominado $\Delta 0539-1075$). El primero de los mutantes se realizó mediante la inserción de un casete que otorga resistencia al antibiótico gentamicina en el gen LPU83_pLPU83b_0539, el segundo por delección del gen y, por último, el doble mutante siendo insercional para el gen homólogo a *hrrP* y delecional para el gen homólogo a *sapA* (las construcciones se detallan en el capítulo II sección II.2.9).

Una vez confirmados los mutantes genotípicamente, se decidió evaluar el fenotipo simbiótico de los mismos realizando ensayos en *M. truncatula* A20 e inoculando semillas germinadas con las distintas cepas de LPU83, utilizando a *S. meliloti* C307 como control positivo de cepa fijadora. Luego de 6 semanas de crecimiento, no se observaron diferencias en los valores de peso seco de parte aérea entre aquellas plantas inoculadas con LPU83 y aquellas inoculadas por las cepas mutantes (Figura VII.3.A). Las plantas se ven pequeñas y con hojas amarillas, sin diferencias con las plantas que no fueron inoculadas. Al observar los nódulos, aquellos generados por las cepas de *R. favelukesii* LPU83 mutantes en las peptidasas eran pequeños, redondeados y blancos (como la cepa salvaje). Por otro lado, también se determinó el número de nódulos totales de las plantas luego de 6 semanas y observamos que, para todos los mutantes realizados, no hay diferencias con la cepa salvaje de LPU83 (Figura VII.3.B).

Los resultados de los ensayos indican que las mutaciones en las peptidasas de LPU83 no serían suficientes para alterar el fenotipo ineficiente en la FBN que presenta la cepa, tanto para las peptidasas homologas a *hrrP*, como aquella homóloga a *sapA*.

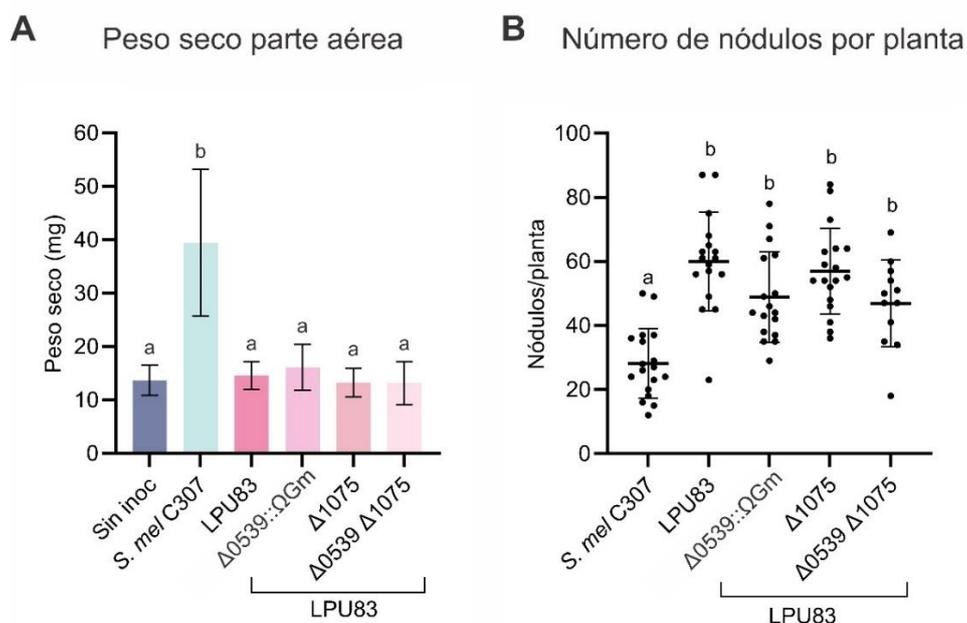


Figura VII.3. Efecto de la mutación de las peptidasas presentes en LPU83 en *M. truncatula* A20. **A.** Peso seco de la parte aérea de las plantas luego de 6 semanas inoculadas con *S. meliloti* C307, LPU83, las tres cepas mutantes y el control sin inoculo bacteriano (sin inoc). **B.** Número de nódulos por planta para los distintos tratamientos. Gráficos representativos de dos experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas. ANOVA con test de Tukey *p*-value menor a 0,05.

Debido al resultado negativo de los ensayos con plantas, surgió el interrogante si la mutación de los genes podría estar afectando al fenotipo de la cepa de alguna forma. Al ser proteasas, el perfil proteómico de las cepas mutantes podría estar cambiando. Por ello, se realizaron ensayos de proteómica sobre la cepa salvaje LPU83 y los mutantes en vida libre para evaluar si había diferencias entre los mutantes en cultivos líquidos. Si bien en los cultivos de LPU83 salvaje no se detectó a LPU83_pLPU83b_0539 ni a LPU83_pLPU83b_0540, el mutante $\Delta 0539::\Omega Gm$ presentó proteínas diferencialmente expresadas al compararse con LPU83. Esto indicaría que a pesar de que LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540 se encuentran en bajas cantidades dentro de las bacterias y no es posible detectarlo por la metodología utilizada, la mutación en las proteínas es suficiente para generar una alteración en el perfil proteómico de LPU83, que depende de la expresión basal de estas proteínas. Para el caso de LPU83_1075, la proteína se detectó en LPU83 y su mutación también mostró proteínas diferencialmente expresadas con la cepa control. La tabla con los genes diferenciales se encuentra en el anexo (Tabla A28). Esto se corresponde con los datos transcriptómicos mencionados previamente, donde se observó que LPU83_1075 se expresaba en vida libre y dentro del nódulo, mientras que LPU83_LPU83b_0539 y LPU83_LPU83b_0540 sólo dentro del nódulo. Para el caso del doble mutante, vemos que hay más de 30 proteínas diferenciales, de las cuales 11 no son detectadas en el

mutante pero si en la cepa salvaje. Si bien las mutaciones no lograron revertir el fenotipo simbiótico, se pudo comprobar que estos genes regulan la expresión de otras proteínas en LPU83.

VII.6. Efecto de la sobreexpresión de las peptidasas en el fenotipo simbiótico

Benedict *et al.* (2021) determinaron que la expresión del gen *sapA* bajo el promotor de *hrrP* alteraba el fenotipo simbiótico de *S. meliloti* en *M. truncatula* A20. Al sobreexpresar esta peptidasa, las plantas inoculadas tenían un menor peso seco y nódulos de menor tamaño. Para evaluar si las peptidasas presentes en LPU83 generaban una alteración en la simbiosis de *S. meliloti* en *M. truncatula* A20, se adoptó una estrategia similar. Para ello, se clonaron las tres peptidasas identificadas en LPU83 en el vector replicativo pPG013 (Benedict *et al.*, 2021) y se generaron tres construcciones: pPG013::0539 (con el gen LPU83_pLPU83b_0539), pPG013::0539-40 (con los genes LPU83_pLPU83b_0539 y LPU83_pLPU83b_0540) y pPG013::1075 (con el gen LPU83_1075). Luego fueron transferidas a la cepa *S. meliloti* C307, utilizada en estudios previos para evaluar el posible efecto de estas peptidasas (Benedict *et al.*, 2021). Se inocularon plantas de *M. truncatula* A20 y a las 6 semanas se evaluó el efecto de estas construcciones. En los ensayos se incluyeron plantas inoculadas con *S. meliloti* C307 conteniendo los distintos plásmidos control: pPG013 (plásmido vacío), pPG014 (conteniendo el gen *hrrP* de *S. meliloti* B800) y pPG068 (conteniendo el gen *sapA* de *S. meliloti* 1021) (Benedict *et al.*, 2021).

En los ensayos se observó que los nódulos producidos por la cepa parental conteniendo pPG013 eran nódulos alargados y rosados, indicando una fijación de nitrógeno normal. La cepa que portaba el plásmido pPG014 fue la que presentó el fenotipo simbiótico más afectado, con nódulos pequeños, redondos y blancos. Para el caso de los nódulos infectados por cepas que sobreexpresan las peptidasas de LPU83 (pPG013::0539, pPG013::0539-40 y pPG013::1075), no se observaron diferencias con los controles positivos del ensayo. Los nódulos eran alargados y rosados, sin aparentes deformaciones que indicaran un efecto en la FBN. Esto se corrobora con los datos obtenidos de peso seco de la parte aérea de la planta, los cuales muestran que no hay diferencias entre las construcciones conteniendo las peptidasas de LPU83 y aquella conteniendo el plásmido vacío pPG013 (Figura VII.4.A).

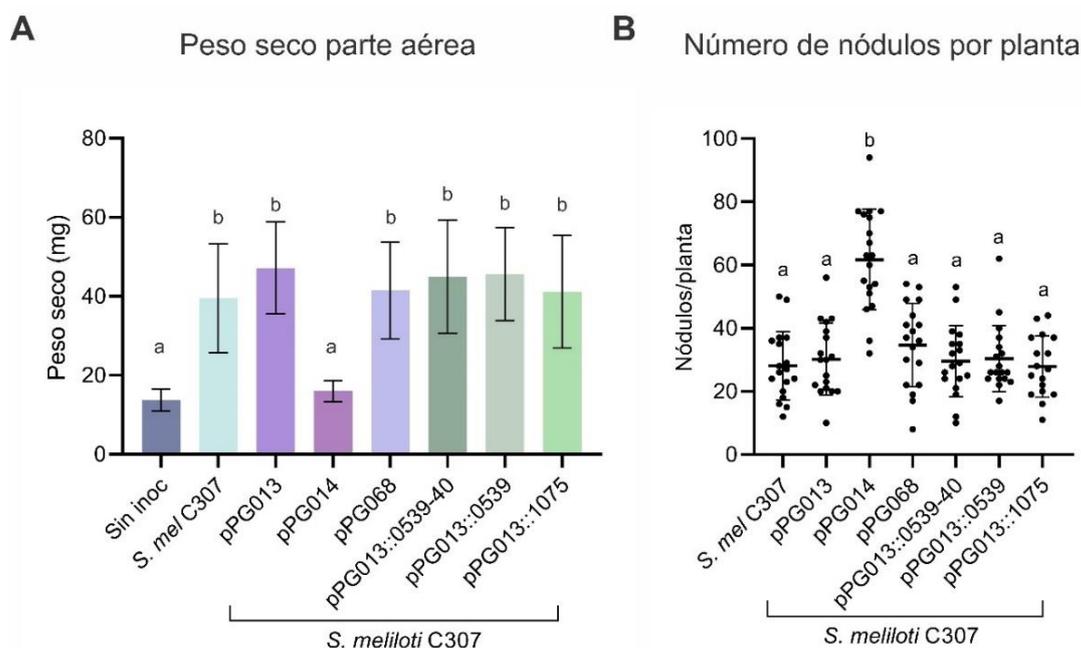


Figura VII.4. Resultados de la sobreexpresión de las peptidasas de LPU83 en *M. truncatula* A20. **A.** Peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con las distintas cepas de *S. meliloti* C307 utilizadas y el control sin inoculo bacteriano (sin inoc). **B.** Número de nódulos por planta. Se analizaron mediante ANOVA con test de Tukey, donde letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos con *p-value* menor a 0,05.

El número de nódulos por planta para las distintas construcciones portando las peptidasas de LPU83 no mostró diferencias con las de la cepa portadora del plásmido pPG013, siendo únicamente *S. meliloti* C307 (pPG014) la construcción que generó un aumento diferencial del número de nódulos (Figura VII.4.B). Al analizar el número de bacterias viables dentro de los nódulos no se observaron diferencias entre los nódulos sobreexpresando LPU83_1075 y aquellos con el plásmido control pPG013. Lo mismo sucede con las construcciones sobreexpresando LPU83_pLPU83_0539 y LPU83_pLPU83_0540 (Figura VII.5). En cambio, los nódulos con bacterias que portan el pPG014 tienen un menor número de UFC/mg de nódulo al compararse con cualquiera de los otros inóculos. Esto podría deberse al hecho de que los nódulos a las 6 semanas post inoculación ya se encuentren senescentes.

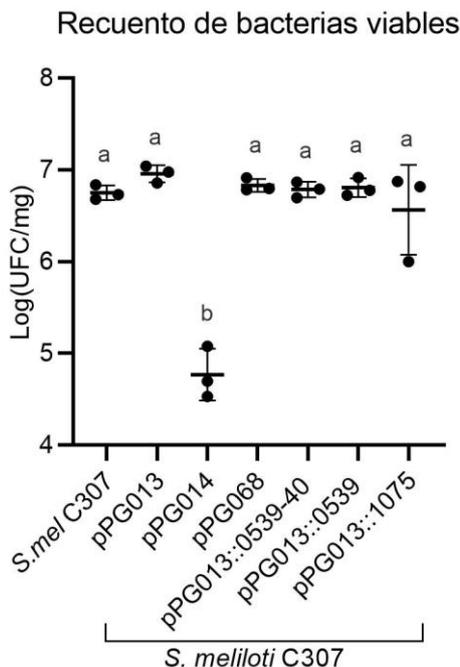


Figura VII.5. Recuento de bacterias viables de los nódulos de *M. truncatula* A20. Se expresan como Log (UFC/mg de nódulo húmedo). Se realizó ANOVA con test de Tukey, diferencias significativas se indican con letras distintas y tienen *p-value* menor a 0,05.

Con el fin de evaluar si la sobreexpresión de estos genes alteraba la morfología del nódulo o los bacteroides, se realizaron cortes longitudinales y una tinción con yoduro de propidio y Syto9 de los nódulos previamente a la observación en el microscopio confocal. Como se muestra en la figura VII.6, no se observan grandes diferencias en la morfología de los nódulos entre los distintos tratamientos. Las células del nódulo se ven ocupadas por bacteroides teñidos con Syto9, indicando que los bacteroides se encuentran vivos. Llamativamente, y pese a que no detectamos diferencias en peso seco, para las cepas que portaban los plásmidos con las peptidasas de LPU83 observamos que hay una mayor cantidad de células vegetales con bacteroides teñidos de yoduro de propidio, indicando una proporción de bacteroides muertos mayor que en el caso del control. Sorprendentemente, los bacteroides que sobreexpresan *hrrP* (pPG014), pese a su fenotipo simbiótico sumamente alterado, poseen un gran porcentaje de células vegetales con bacteroides vivos.

De esta manera, se observa que más allá de unas pequeñas alteraciones en la proporción de bacterias muertas dentro del nódulo donde se sobreexpresan las peptidasas presentes en LPU83, esto no es suficiente para provocar una alteración drástica en el fenotipo simbiótico como si lo genera la sobreexpresión de la peptidasa HrrP de *S. meliloti*.

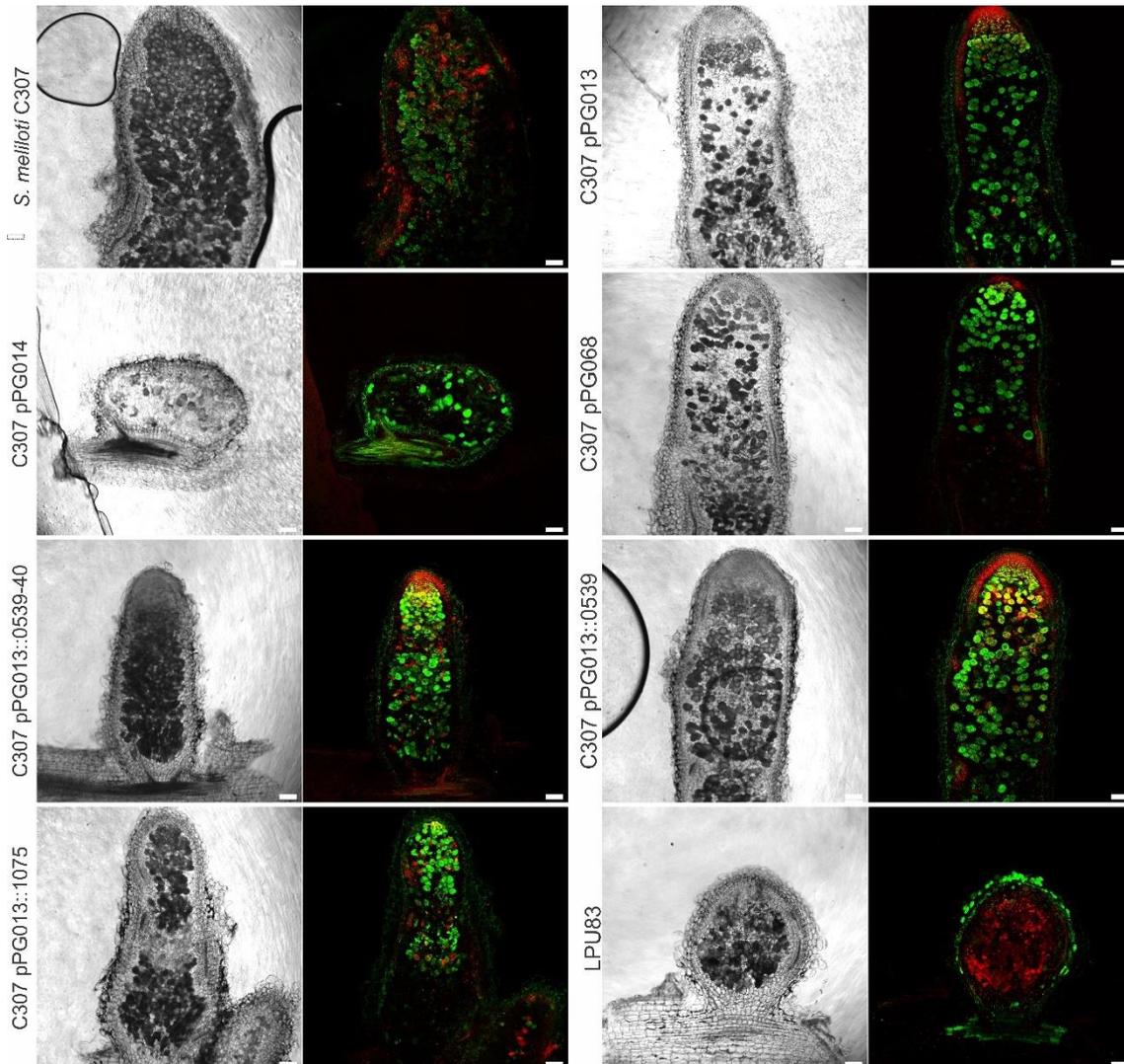


Figura VII.6. Microscopía confocal de nódulos de *M. truncatula* A20. Secciones longitudinales de nódulos infectados con las cepas portadoras de las construcciones que sobreexpresan las peptidasas estudiadas. Cortes de 50 μm de espesor realizados con vibrótomo. La primera imagen corresponde al campo claro y la segunda al *merge* de los canales de ioduro de propidio (rojo) y Syto9 (verde). La escala se indica con una barra blanca en cada imagen y corresponde a 100 μm .

VII.7. Conclusiones parciales

El análisis del transcriptoma de *M. truncatula* mostró cambios diferenciales en la expresión de genes al comparar nódulos eficientes e ineficientes, encontrando respuestas diferenciales en la expresión de NCRs, genes descritos como claves en el desarrollo de un nódulo eficiente en la FBN. En especial, se encontraron conjuntos de NCRs que se expresan tanto en nódulos eficientes como ineficientes en la FBN que no serían esenciales para la diferenciación, y conjuntos de genes con expresión diferencial entre nódulos eficientes e ineficientes. Estos últimos son grandes candidatos para estudiar su rol en la simbiosis. En tanto al fenotipo de LPU83, los transcriptomas de *M. truncatula* muestran que la respuesta de NCRs es muy distinta a la generada frente a

Sm2011, demostrando que la expresión de estos genes podría ser el causante de los defectos en la diferenciación previamente descritos.

En este capítulo, se determinó la presencia de proteínas homólogas a HrrP y SapA en *R. favelukesii* LPU83, previamente descritas como peptidasas relacionadas al metabolismo de NCRs e involucradas en el desarrollo de nódulos eficientes en la FBN.

La mutación de los genes homólogos en LPU83 no mostró cambios en el fenotipo simbiótico de esta bacteria en *M. truncatula* A20. No se observaron cambios en los parámetros simbióticos medidos de los mutantes $\Delta 0539::\Omega Gm$ y $\Delta 1075$, pero si se observan diferencias en sus perfiles proteómicos en vida libre al determinarse aproximadamente 30 proteínas diferencialmente expresadas para cada uno de ellos. Cabe mencionar que el fenotipo de LPU83 en *M. truncatula* A20 parece ser más severo que en *M. truncatula* A17. Al observar al microscopio los nódulos se observa que se encuentran en su mayoría células con bacteroides teñidos con yoduro de propidio sugiriendo bacteroides con membrana celular alterada (Figura VII.6).

En estudios previos se ha determinado que la sobreexpresión de las peptidasas de *S. meliloti* bajo el promotor de *hrrP* lleva a niveles de fijación menores para el caso de *sapA* y muy ineficientes para el caso del gen *hrrP*. La sobreexpresión de las peptidasas de LPU83 no parecen alterar la fijación de nitrógeno de las bacterias; no se observan diferencias a nivel del peso seco de la parte aérea de las plantas, tampoco en la morfología de los nódulos. Sin embargo, hay diferencias al observar cortes de los nódulos al microscopio ya que se observó una mayor cantidad de células vegetales con bacteroides rojos, indicando muerte celular. Esto podría deberse a que la sobreexpresión de estos genes genera una muerte celular prematura, aunque no en la proporción que lo hacen los genes *hrrP* y *sapA* de *S. meliloti*. Dichos resultados muestran que estos genes no cumplirían la misma función en LPU83 que en *S. meliloti*, y no serían actores relevantes en la ineficiencia de LPU83 en la simbiosis.

Capítulo VIII:
Discusión general y conclusiones



VIII.1. Discusión general y conclusiones

Las bacterias pueden establecer interacciones con organismos complejos de manera simbiótica o parasítica. Para que en una simbiosis ambos organismos se vean beneficiados, éstos expresan una serie de determinantes, precisamente modulados, que les permiten interactuar. El desarrollo de una simbiosis entre las bacterias y sus hospedadores abarca numerosas etapas, incluyendo un diálogo molecular que desencadena procesos extremadamente regulados en ambos simbioses. El conocimiento de los actores implicados en todas estas etapas ha generado avances en la comprensión de la simbiosis. Estos avances han permitido el uso de algunas interacciones simbióticas para generar mejoras directas en la calidad de vida del hombre. Tal es el caso de bacterias probióticas que protegen al hospedador de patógenos (Salonen & de Vos, 2014, Derrien & Veiga, 2017). El estudio de interacciones simbióticas entre bacterias y plantas leguminosas de interés agronómico ha permitido mejorar los rendimientos de cultivos, lo cual beneficia indirectamente al hombre (Ciampitti *et al.*, 2021, de Borja Reis *et al.*, 2021, Benmrid *et al.*, 2023).

El estudio de la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas es de gran importancia para el desarrollo de cultivos de interés agronómico y también contribuye al ciclo del nitrógeno (Porter *et al.*, 2024). En la actualidad, las prácticas agrícolas que se llevan a cabo requieren el uso de fertilizantes nitrogenados sintetizados químicamente para alcanzar mayores rendimientos debido, principalmente, al empobrecimiento en N de los suelos. Lamentablemente, tanto en la manufactura de los fertilizantes como en su liberación, se contribuye al efecto invernadero y a la eutrofización de las aguas (Mosier, 2001, Smith *et al.*, 2007). El uso de rizobios como inoculantes para la introducción de N a los suelos de manera no perjudicial para el medio ambiente es una práctica habitual que aprovecha el conocimiento científico logrado sobre estas bacterias para la producción agronómica (Checcucci *et al.*, 2017, Mei *et al.*, 2021, Kumar *et al.*, 2022).

La mencionada simbiosis implica etapas altamente coordinadas entre ambos simbioses y depende de numerosos genes, tanto de la planta como de la bacteria, que son responsables de lograr una interacción saludable. El rizobio debe ser capaz de infectar a la planta, progresar en su interior y alcanzar un estadio final dentro de los nódulos, órgano nuevo en la raíz de la planta donde la bacteria se diferencia en bacteroide, un estado fijador de nitrógeno en el que entrega N a la planta mientras que ésta lo abastece de compuestos carbonados (Perret *et al.*, 2000, D'Haese & Holsters, 2002, Jones *et al.*, 2007, Oldroyd & Downie, 2008, Wang *et al.*, 2012). En este sentido, es fundamental conocer en profundidad el proceso de diferenciación y fijación de

nitrógeno para maximizar los rendimientos agronómicos al utilizar rizobios como inoculantes. Los estudios analizando la simbiosis de rizobios eficientes en la fijación de nitrógeno permitieron dilucidar, mediante mutaciones o silenciamiento, determinantes esenciales que de manera individual demostraron un fenotipo alterado (Figura I.7) (Jones *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2020). Sin embargo, no se han reportado análisis en masa que permitan identificar numerosos candidatos a estar involucrados en el proceso de manera general. En este sentido parece necesario, de una manera más amplia, conseguir una colección de genes involucrados en la diferenciación en bacteroides para estudiar detalladamente a futuro.

Sinorhizobium (*syn. Ensifer*) *meliloti* es la bacteria modelo de la interacción simbiótica eficiente en la fijación biológica de N₂ (FBN) entre rizobios y *Medicago truncatula*. Esta planta pertenece a la familia del clado invertido que carece de repeticiones (IRLC por *inverted repeat-lacking clade*) y genera nódulos indeterminados en sus raíces (Kondorosi *et al.*, 2013). *Rhizobium favelukesii* es una cepa capaz de nodular distintas leguminosas, entre ellas el género *Medicago* spp., pero es ineficiente en la FBN (Del Papa *et al.*, 1999, Wegener *et al.*, 2001). Con el objetivo final de conseguir un conjunto de genes involucrados en el proceso de diferenciación en bacteroides, hipotetizamos que la comparación de nódulos eficientes e ineficientes en la FBN nos permitiría adentrarnos en los procesos moleculares que son clave en la formación de nódulos fijadores de N₂ eficientes. Para ello, utilizamos a *S. meliloti* 2011 (**Sm2011**) y *Rhizobium favelukesii* LPU83 (**LPU83**) como cepas modelo para realizar ensayos comparativos y dilucidar un conjunto de genes claves para la diferenciación del bacteroide y la FBN eficiente.

R. favelukesii LPU83 se caracterizó como un rizobio ineficiente (Torres Tejerizo *et al.*, 2016) y la escasa caracterización simbiótica disponible sólo evidenciaba alteraciones generales en el desarrollo del nódulo (Wegener *et al.*, 2001). En este trabajo de tesis doctoral, en primer lugar, extendimos la caracterización del fenotipo simbiótico ineficiente de LPU83, con el objetivo de establecer a este rizobio como referente para estudios comparativos. Wegener *et al.* (2001) realizaron una primera caracterización de LPU83 en simbiosis con *M. sativa*, observando alteraciones en el desarrollo y un elevado número de bacterias viables recuperadas del nódulo. En este trabajo, extendimos la caracterización de la simbiosis de LPU83 con *M. sativa* y la comparamos con *M. truncatula*. Los nódulos de LPU83, como en otros trabajos (Del Papa *et al.*, 1999, Segundo *et al.*, 1999, Torres Tejerizo *et al.*, 2010, Torres Tejerizo *et al.*, 2011), presentaron un aspecto similar en ambas leguminosas: pequeños, redondos y de color blanco, a diferencia de los de Sm2011, que son alargados, cilíndricos y rosados. Las plantas no presentaron diferencias en peso seco con los controles sin

inocular, indicando una ineficiencia a la hora de fijar nitrógeno. Mediante distintas técnicas microscópicas observamos que los bacteroides de LPU83 no se encuentran elongados dentro de los nódulos, los cuales presentan un inicio de desarrollo de la zona de senescencia temprano (Figuras III.1 y III.2). La tinción de secciones de nódulo de *M. truncatula* mostró que las células de la planta contenían un menor número de bacteroides de LPU83 en comparación con aquellos infectados con Sm2011, con células vegetales menos ocupadas y con un mayor porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio (Figuras III.3 y III.4). El yoduro de propidio se intercala en el ADN pero únicamente lo hace cuando las membranas se encuentran dañadas y son permeables al mismo. Usualmente, si las células no presentan daños, el yoduro de propidio no puede atravesar la membrana (Haag *et al.*, 2011). Las microscopías realizadas nos sugirieron que, al menos, la membrana de los bacteroides de LPU83 se encontraba alterada en mayor medida que en los bacteroides de Sm2011 y que el proceso del desarrollo de la diferenciación se veía afectado, por lo que pudimos establecer a LPU83 como modelo de un desarrollo del nódulo defectuoso.

La transcriptómica dual permite, en una misma muestra, determinar la expresión de genes de dos organismos (Westermann *et al.*, 2017). En los ensayos realizados en este trabajo de tesis, la transcriptómica dual de nódulos de *M. truncatula* infectada con distintos rizobios nos permitió secuenciar tanto ARN de la bacteria como de la planta. El análisis de los transcriptomas demostró que las réplicas obtenidas fueron congruentes y que, mediante el método utilizado, logramos evidenciar diferencias notorias (Figura IV.2). La elección de dos tiempos post inoculación distintos se fundamenta en los dos cambios transcripcionales grandes que han sido descritos en los nódulos durante la simbiosis (Maunoury *et al.*, 2010). *M. truncatula* posee anotados 51.160 genes, de los cuales identificamos en la transcriptómica de los nódulos 43.991, un 86% de los mismos. El análisis de expresión diferencial para los nódulos de *M. truncatula* mostró numerosos genes diferenciales por comparación realizada, en ambos tiempos estudiados (Tabla IV.2 y Tabla IV.3). Más específicamente, al comparar nódulos eficientes de Sm2011 con ineficientes de LPU83 encontramos 2946 y 1917 genes a 10 y 31 dpi, respectivamente (Tabla IV.2). Esto nos indica que entre un 5% y un 3,7% de los genes de la planta se reprograman entre un proceso eficiente e ineficiente. Logramos determinar conjuntos de genes con comportamiento similar, los cuales se clasificaron según sus términos GO (“*gene ontology*”) (Ashburner *et al.*, 2000). Mediante esta clasificación realizamos un análisis de enriquecimiento de genes dividiéndolos en funciones moleculares y procesos biológicos enriquecidos. De esta manera, pudimos establecer procesos estadísticamente presentes en cada condición. Determinamos dos grupos de genes,

uno a 10 y otro a 31 dpi, que corresponden a aquellos que se inducen dentro de los nódulos, independientemente del rizobio con el que fue inoculado (Tablas A10 y Tabla A11). A 10 dpi, encontramos enriquecidos procesos relacionados a biosíntesis de lípidos y metabolismo del ADN (Tabla IV.4). En los nódulos a 31 dpi, una respuesta asociada a la biosíntesis de flavonoides y biosíntesis de metabolitos (Tabla IV.4). También, detectamos un grupo de genes de *M. truncatula* inducido únicamente en los nódulos eficientes en la fijación de N, conteniendo aproximadamente 200 genes. A 10 dpi, la única función molecular enriquecida fue la unión a iones metálicos, con una gran cantidad de genes que codifican para péptidos ricos en cisteína específicos de nódulo (NCRs, “*nodule cystein-rich peptides*”) (Tabla IV.5). En los nódulos eficientes a 31 dpi encontramos enriquecidos distintos procesos biológicos relacionados a una correcta FBN y crecimiento de la planta (Tabla IV.5). Estos resultados son coherentes con el fenotipo y la bibliografía para nódulos eficientes (Jones *et al.*, 2007, Kondorosi *et al.*, 2013, Roy *et al.*, 2020).

Específicamente, al comparar nódulos de Sm2011 contra aquellos infectados por LPU83, observamos una clara diferencia en los procesos biológicos enriquecidos. La respuesta de la planta a la infección con Sm2011 a 10 dpi se centró principalmente en la regulación de las concentraciones de O₂ dentro de los nódulos y la diferenciación bacteriana, con la función molecular relacionada a los NCRs enriquecida (Tabla IV.7). La regulación de las concentraciones de O₂ es necesaria para el buen funcionamiento del complejo de la nitrogenasa, y la presencia de leghemoglobinas de la planta garantiza esta condición (Ott *et al.*, 2005, Poole *et al.*, 2018). En cambio, en los nódulos generados por LPU83, la planta mostró una inducción de la respuesta de defensa de la planta y una continua inducción de la síntesis de flavonoides (Tabla IV.7). Esto tendría correlación con el hecho de que en los bacteroides de LPU83 los genes *nod* están expresándose (Tabla VI.1) por lo que continua la síntesis de factores de nodulación (factores Nod, FN). La síntesis de flavonoides expone una necesidad de la planta, la falta de nitrógeno disponible y, por ende, el requerimiento de la infección por rizobios que puedan hacer una FBN eficiente (Caetano-Anolles & Bauer, 1988). Una respuesta similar observamos a 31 dpi, donde los nódulos de Sm2011 presentaron funciones enriquecidas relacionadas al metabolismo de un nódulo eficiente, y en los nódulos de LPU83 se mantuvo enriquecida la respuesta de defensa de la planta (Tabla IV.8). Recientemente, se ha demostrado un fenotipo similar al que hemos obtenido en nódulos indeterminados, pero al analizar nódulos determinados de soja, inoculando cepas con distintas compatibilidades simbióticas (Zadegan *et al.*, 2024). La respuesta de *Glycine soja* a *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 implica genes relacionados al transporte de aminoácidos y nitratos, junto con genes involucrados en la unión a O₂. Por otro lado, la

respuesta de la planta al ser colonizada por *B. diazoefficiens* LVM105, un rizobio que induce la formación de nódulos vacíos (sin infección), activa genes asociados a la biogénesis de pared celular y genes de respuesta de defensa de la planta (Zadegan *et al.*, 2024).

La expresión de genes simbióticos necesarios para la correcta FBN nos demostró que las diferencias entre nódulos eficientes e ineficientes se observan principalmente en la etapa de maduración de los bacteroides y en el metabolismo y transporte en el nódulo (Tabla IV.9 y tabla IV.10). En nódulos ineficientes detectamos genes con menor expresión involucrados en el transporte de molibdeno al nódulo (*MtMOT1.3*). Ha sido demostrado que este transportador es necesario para una correcta FBN (Tejada-Jimenez *et al.*, 2017). Estas observaciones, junto con la ausencia de vías relacionadas al oxígeno enriquecidas en nódulos ineficientes (enriquecida en nódulos eficientes) nos sugiere que la nitrogenasa podría no funcionar correctamente debido a niveles altos de O₂ dentro de los nódulos y a una posible ausencia del cofactor molibdeno, esencial para esta enzima. Estos resultados son coherentes con los ensayos de reducción de acetileno realizados por Wegener *et al.* (2001), donde determinaron que los nódulos de LPU83 en *M. truncatula* fijaban un 7% de lo que fijaban los nódulos eficientes de Sm2011. La expresión de distintas leghemoglobinas, proteínas necesarias para la unión y transporte de O₂ en los nódulos, fue mayor en los nódulos de Sm2011 que en los de LPU83. Por otro lado, el factor de transcripción MtNLP2, implicado en la regulación de la expresión de estas proteínas (Jiang *et al.*, 2021), también se expresó en mayor medida en los nódulos eficientes. Estos datos confirmarían que la ausencia de coloración rosada de los nódulos asociada a las leghemoglobinas pueda deberse a concentraciones bajas de las mismas.

El fenotipo simbiótico de LPU83 muestra un mayor número de nódulos por planta que *S. meliloti* en alfalfa (Del Papa *et al.*, 1999) lo cual es una respuesta asociada a una FBN ineficiente como ya ha sido demostrado en ensayos con otros rizobios (Caetano-Anolles & Bauer, 1988). Es coherente pensar que, ante el déficit de N, en la planta se encuentre la vía de síntesis de flavonoides enriquecida; específicamente, el gen *MtCHS* (chalcona sintasa), involucrada en dicha vía se expresa más en nódulos ineficientes que en los nódulos eficientes, corroborando este fenotipo con mayor nodulación (Tabla IV.10). A su vez, el fenotipo de desarrollo de nódulos continuamente cuando son ineficientes puede relacionarse con la mayor expresión del gen *MtTML2* (Tabla IV.10) y su rol en la regulación negativa del número de nódulos en *M. truncatula* (Gautrat *et al.*, 2019).

Detectamos una gran cantidad de genes diferenciales al comparar bacteroides de las distintas cepas bacterianas contra las bacterias en vida libre (Tabla IV.12 y Tabla

IV.13). Esto demuestra los grandes cambios transcripcionales que sufren los rizobios al infectar las leguminosas. En particular, tanto Sm2011 como LPU83 aumentaron en mayor medida la expresión de genes presentes en sus plásmidos simbióticos (pSymA y pLPU83b, respectivamente) dentro de los bacteroides (Figura IV.4 y Figura IV.8). Mientras que los genes cromosomales mostraron mayor expresión en vida libre, es decir disminuyen su expresión en los bacteroides (Figura IV.4 y Figura IV.8). Estos resultados, resaltan el rol funcional de los plásmidos simbióticos como se ha descrito en otros trabajos (Capela *et al.* 2006, Roux *et al.* 2014).

Es interesante destacar que, así como la planta altera la expresión de ca. 2000 genes al ser infectadas por Sm2011 o Sma818B (cepas que sólo difieren en el plásmido simbiótico) (Tabla IV.2), al comparar los genes expresados en los bacteroides contra las bacterias en vida libre a 31 dpi para Sm2011 y para Sma818B, encontramos ca. 3200 GEDs (Tabla IV.13) y ca. 1800 GEDs (no mostrado), respectivamente. Esto implica y refuerza la dinámica relación entre replicones y confirma que gran parte de las diferencias en la respuesta de *M. truncatula* se debe a las diferencias en los genes presentes en los plásmidos simbióticos.

Para el análisis de genes bacterianos ortólogos entre LPU83 y Sm2011, utilizamos el cambio de la expresión de cada gen con respecto a la expresión de las bacterias en vida libre (sección IV.4.3). El análisis de genes ortólogos comprendió 3452 genes que codifican para proteínas. Si se tiene en consideración que el genoma de LPU83 posee 7700 y el de Sm2011, 6299, se observa que muchos elementos no son compartidos. De esta manera, la comparación de genes ortólogos pierde, en cierto sentido, la evaluación de la mitad de los elementos de cada genoma. Entre estos elementos no evaluados (ca. 3000-3500 genes) y la escasa cantidad de genes con comportamiento disímil (74 genes), se podría sugerir que la diferencia en la expresión de genes no parece ser lo más importante a la hora de la eficiencia en la fijación de N₂, sino que la ausencia o presencia de genes tendría una mayor relevancia a la hora de dirigir el fenotipo simbiótico de la cepa. Cabe mencionar que no hemos podido encontrar herramientas bioinformáticas que nos permitan comparar de manera estadística genes ortólogos de diferentes especies en experimentos con réplicas biológicas, lo cual podría facilitar este tipo de análisis.

Como mencionamos, los genes que presentaron inducción o disminución, en su mayoría, se comportaron de la misma manera tanto en LPU83 como en Sm2011 dentro de bacteroides (Tabla IV.14). Sin embargo, detectamos 74 genes con expresión opuesta en los bacteroides: aproximadamente la mitad expresados en mayor medida en los bacteroides de LPU83 y disminuidos en los de Sm2011, mientras que la otra mitad presentó un comportamiento invertido (mayor en los bacteroides de Sm2011 y

disminuidos en los de LPU83) (Tabla IV.15). La lista de genes junto con su valor de $\log_2\text{FoldChange}$ se encuentra en el anexo (Tabla A26-A27). Consideramos que estos genes son grandes candidatos para evaluar su implicancia en los fenotipos eficientes e ineficientes mediante ensayos de mutagénesis y/o sobreexpresión de los mismos.

Cabe mencionar que, desde la aparición de técnicas de secuenciación masiva de genomas, la disponibilidad de estos en las bases de datos aumentó exponencialmente. Si bien ha habido numerosos desarrollos que permiten anotar los elementos codificados en dichos genomas, una gran proporción de estos elementos tienen funciones hipotéticas o funciones desconocidas. Es decir, sabemos que están, pero no sabemos qué hacen exactamente. A lo largo de nuestros análisis comparativos hemos encontrado que una gran proporción de los genes cuya expresión es diferencial no tiene una función asignada, por lo que nos fomenta a realizar aproximaciones bioquímicas sobre estos genes para conocer su función en mayor detalle.

La diferenciación terminal en los nódulos de *M. truncatula* y *M. sativa* comprende una serie de pasos donde el genoma bacteriano se endorreduplica. En este proceso, la bacteria sufre una serie de ciclos de duplicación del ADN sin división celular, resultando en bacteroides poliploides y elongados (Mergaert *et al.*, 2006). Los cambios morfológicos de los bacteroides dependen también de la planta utilizada como hospedadora (Montiel *et al.*, 2016). Al estudiar el transcriptoma de LPU83 y Sm2011, analizamos la distribución de COGs entre los genes expresados diferencialmente dentro de los bacteroides. Para Sm2011, observamos dentro de la categoría de metabolismo del ADN (replicación, recombinación y reparación, L) que el total de genes que aumentan y disminuyen significativamente su expresión dentro del nódulo es similar (Figura IV.10). Mientras que la categoría de biogénesis de la membrana celular (M) hay una mayor cantidad de genes que tienen mayor expresión en vida libre. En el transcriptoma de LPU83, observamos una relación distinta: hay una mayor proporción de genes sobreexpresados en bacteroides pertenecientes a la categoría de metabolismo del ADN, pero la cantidad de genes pertenecientes a biogénesis de membrana tiene una cantidad similar de genes sobreexpresados y disminuidos dentro de los bacteroides (Figura IV.6). Estos resultados nos sugieren que dentro de los bacteroides eficientes, como los de Sm2011, hay una mayor represión de genes relacionados a la síntesis de la membrana celular que genes inducidos para aumentar la replicación del ADN, llevando así a la endorreduplicación del genoma de los bacteroides. Lo contrario estaría sucediendo en los bacteroides de LPU83: se sobreexpresan genes para replicar el ADN, pero no se reprimen los genes para evitar la división celular. En el capítulo V, evaluamos la expresión de distintos genes relacionados

al ciclo celular bacteriano. Los genes *ftsK* y *ftsZ*, involucrados en la división celular, disminuyeron su expresión en los bacteroides de LPU83 a 10 dpi, pero no así a 31 dpi (Tabla V.1). Esto nos sugeriría que la división celular se detiene a ese tiempo post inoculación, pero a 31 dpi se reinicia y no hay diferencias entre bacteroides y bacterias en vida libre para LPU83. A partir de estos resultados transcriptómicos, decidimos observar con aún mayor detalle la morfología y el largo de los bacteroides, constatando que los bacteroides de Sm2011 se elongan y ramifican en comparación a las células en vida libre, mientras que los de LPU83 mantienen su tamaño y forma (Figura V.2 y Figura V.3). A su vez, cuantificamos el contenido de ADN tanto en bacteroides de LPU83 extraídos de los nódulos de *M. truncatula* y *M. sativa*, como en bacterias en vida libre. Observamos que los bacteroides de LPU83 presentan un nivel de poliploidía menor al detectado para los bacteroides de Sm2011 (Tabla V.2). Este nivel es aún menor en los bacteroides de *M. truncatula*, indicando que la infección por LPU83 en esta especie muestra un fenotipo más severo que en *M. sativa*. En conjunto, los resultados de expresión genética, morfología y endopoliploidía nos demuestran que los bacteroides ineficientes de LPU83 no endorreduplican su ADN y por lo tanto no estarían iniciando su diferenciación.

La interacción entre rizobios y plantas depende de numerosas moléculas de superficie de la bacteria como lipopolisacáridos y exopolisacáridos (EPS), entre otras, que tienen roles claves en la simbiosis (Leigh *et al.*, 1985, Lagares *et al.*, 1992, Carlson *et al.*, 1995, Niehaus & Becker, 1998, Becker *et al.*, 2002, Oldroyd & Downie, 2008, Castellani *et al.*, 2021). En paralelo a esta tesis, se estudió la producción de EPS en LPU83. Esta cepa produce un EPS I (succinoglicano) que es idéntico al que genera Sm2011, lo que lo descartaría como un problema durante la interacción con la planta. Cabe recalcar que opuesto a lo que sucede en *S. meliloti*, un mutante en la producción del EPS I en LPU83 es capaz de nodular alfalfa (Castellani *et al.*, 2021).

Otras moléculas claves en el proceso son los flavonoides y los factores de nodulación (FNs). Los flavonoides secretados por las raíces de las plantas interactúan con el regulador transcripcional bacteriano NodD, el cual induce la expresión de los genes *nod* (Jones *et al.*, 2007). Estos genes inducen la producción de los FN, necesarios para la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Estudios previos mostraron que el *cluster* de genes *nod* de LPU83 se encuentra en su plásmido pLPU83b (Torres Tejerizo *et al.*, 2011). Los sustituyentes químicos adicionales a la estructura central de los FN juega un papel importante en la simbiosis, ya que se ha demostrado que mutantes de *S. meliloti* en genes necesarios para la sulfatación de los FN no son capaces de nodular (Roche *et al.*, 1991, Schultze *et al.*, 1995). Particularmente, se ha evaluado un mutante en el

gen *nodH* de LPU83, que codifica para una sulfotransferasa de FN, y se ha determinado que es capaz de nodular aún en ausencia de FN sulfatados (Del Papa *et al.*, 2007, Torres Tejerizo *et al.*, 2011). Por otro lado, mutantes en genes como *fix* o *nif* o la ausencia de los mismos generan fenotipos ineficientes en la fijación de nitrógeno en *S. meliloti* (Fischer, 1994). La secuenciación del genoma de LPU83 permitió identificar genes ortólogos a los genes *fix* y *nif* en el plásmido pLPU83b (Wibberg *et al.*, 2014). Los datos que obtuvimos mediante transcriptómica demostraron que los genes *nod*, *fix* y *nif* de LPU83 aumentan su expresión dentro de los nódulos, similar al comportamiento general de los ortólogos en Sm2011, aunque la FBN no es eficiente (Tabla VI.1). En el capítulo VI mencionamos que la expresión de los genes *nodABC* en *S. meliloti* disminuye en los bacteroides a 31 dpi. Un comportamiento similar fue demostrado por Roux *et al.* (2014) mediante disección de los nódulos y transcriptómica. Nuestros resultados mostraron que en LPU83 estos genes se mantienen activos, lo cual podría actuar en detrimento de una simbiosis eficiente.

Al mismo tiempo que se determinó la sulfatación de los NFs de LPU83, se observó que los mismos están N-metilados en el extremo no reductor y el ácido graso del mismo extremo es de 18 o 20 carbonos (Torres Tejerizo *et al.*, 2011). Esto los diferencia de Sm2011, cuyos NFs no están N-metilados y el ácido graso es de 16 carbonos. Esto podría sugerir que las diferencias en los FN podrían estar asociadas a las diferencias en el desarrollo del nódulo. Por ello, intentamos determinar si la expresión heteróloga de genes simbióticos de *S. meliloti* en LPU83 podía resultar en un fenotipo eficiente en la FBN. Para ello complementamos tanto la cepa salvaje, LPU83, como aquella curada de su plásmido simbiótico, LPU83 pSym⁻, con genes de *S. meliloti*. En colaboración con el Dr. Barney Geddes, llevamos a cabo complementaciones utilizando plásmidos replicativos en rizobios portando los genes *fix* y *nif* (pNif) y genes *nod* (pNod) (Figura VI.1). Estos dos plásmidos fueron previamente construidos y portan los genes mínimos esenciales para una simbiosis efectiva con alfalfa (Geddes *et al.*, 2020). Mediante ensayos en planta demostramos que la expresión heteróloga de estos genes no alcanza un fenotipo simbiótico eficiente ni en LPU83 ni en LPU83 pSym⁻ (Figura VI.2). En cuanto a la fijación de nitrógeno, no observamos diferencias en los valores de peso seco con el control sin inocular con rizobios (Figura VI.2). De esta manera, la mera expresión de los genes *nod*, *fix* y *nif* no sería suficiente para generar una simbiosis eficiente en la fijación de nitrógeno en el entorno de LPU83.

La microscopía confocal de secciones de estos nódulos infectados por los rizobios portadores de los plásmidos pNod y pNif, demostró que las células vegetales infectadas por las distintas cepas presentan una mayor proporción de células teñidas con yoduro de propidio (Figura VI.3 y Figura VI.4). Nuestras observaciones indican, al menos, una

alteración en la membrana celular de las mismas. Sin embargo, los recuentos de bacterias viables dentro del nódulo no presentaron una disminución en la cantidad de rizobios totales dentro del nódulo (Figura IV.7). Cabe recalcar que los recuentos en medios suplementados con antibióticos mostraron una disminución en el número de bacterias viables dentro de los nódulos (Figura VI.5). Esto podría deberse a que los plásmidos pNod y pNif sean inestables dentro de los nódulos y que los rizobios los pierdan durante la infección. De esta manera, el recuento total de bacteroides correspondería a una población mixta de rizobios, conteniendo o no los plásmidos estudiados. La tinción roja que observamos numerosas veces en los nódulos podría deberse a algún tipo de estructura que se genere en los mismos como respuesta de defensa de la planta. Sin embargo, otra posible explicación a la mayor proporción de células teñidas con yoduro de propidio en el nódulo podría ser la muerte de los rizobios portadores de los plásmidos pNod o pNif. De esta forma, la disminución en el recuento de bacterias viables seleccionando con los antibióticos de los plásmidos podría deberse a que efectivamente estas bacterias mueren dentro de los nódulos. Mutantes en *bacA* en *S. meliloti* muestran simbiosomas con bacteroides sin diferenciar y teñidos con este mismo fluoróforo al utilizar esta tinción en secciones de nódulos (Haag *et al.*, 2011). Sin embargo, no lo podemos correlacionar a una disminución del número de bacterias viables por nódulo al no haber sido medido este parámetro en los trabajos que han sido publicados (Glazebrook *et al.*, 1993, Karunakaran *et al.*, 2010, Haag *et al.*, 2011, diCenzo *et al.*, 2017). El inicio de una diferenciación por parte de las cepas derivadas de LPU83 portadoras de los plásmidos pNod y pNif no pareciera estar ocurriendo, ya que, en caso de iniciar el proceso, los bacteroides podrían verse elongados o al menos teñidos con Syto9 como los bacteroides generados por la cepa control *S. meliloti* Sma818R (pNod, pNif) (Figura VI.6). El hecho que la expresión de los genes simbióticos bacterianos no mejore el fenotipo de la cepa puede deberse a que la falla en la simbiosis no estaría únicamente relacionada a la expresión de los genes mencionados, ya que estos incluso se están expresando en LPU83 (Tabla VI.1).

La complementación de *S. meliloti* Sma818R, cepa derivada de *S. meliloti* 2011 que carece de plásmido simbiótico, con los plásmidos pNod y pNif no logró restaurar el fenotipo eficiente en la FBN, aunque observamos que los bacteroides son viables en los simbiosomas (Figura VI.6). Si bien los genes de los plásmidos provienen de *S. meliloti*, no son específicamente de la misma cepa, por lo que quizá esta variante de *S. meliloti* necesite algún otro determinante para interaccionar correctamente con *M. truncatula* y fijar nitrógeno efectivamente. Por otro lado, estos genes se encuentran usualmente en plásmidos, cuyo número de copias en la bacteria va a depender de la maquinaria de replicación plasmídica (Ramirez-Romero *et al.*, 2000). La expresión de los genes debe

ser precisa y coordinada, que los genes se estén expresando desde los plásmidos pNod y pNif, los cuales no tienen los orígenes de replicación usuales de *S. meliloti*, puede cambiar el número de copias alterando la carga genética y, por lo tanto, la simbiosis. a alteración de fenotipos debido a la presencia/ausencia de plásmidos que alteran la regulación genética fina es un suceso reportado en numerosas ocasiones y en variedad de interacciones (Hynes *et al.*, 1985, Brom *et al.*, 1992, Pistorio *et al.*, 2003, Crook *et al.*, 2012, Lopez-Fuentes *et al.*, 2014, Torres Tejerizo *et al.*, 2014).

Se ha descrito que la planta es quien dirige la diferenciación de las bacterias dentro de los nódulos mediante la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana denominados NCRs (Van de Velde *et al.*, 2010, Guefrachi *et al.*, 2014). Estos péptidos son secretados por la planta y dirigidos a los bacteroides dentro de los simbiosomas donde se ha visto que genes como *bacA* son esenciales para su procesamiento (Haag *et al.*, 2011). Distintos NCRs han sido descritos como fundamentales para la diferenciación, implicados en distintos procesos ineludibles para la maduración de los bacteroides (Mergaert *et al.*, 2006, Penterman *et al.*, 2014, Horvath *et al.*, 2015, Horvath *et al.*, 2023, Zhang *et al.*, 2023). En este trabajo de tesis doctoral, a partir de los ensayos transcriptómicos evaluamos la expresión de los NCRs codificados por el genoma de *M. truncatula* en los nódulos infectados por LPU83, Sm2011 y Sma818B. En el capítulo VII obtuvimos distintos *clusters* de genes con múltiples patrones de expresión (Figura VII.1). Entre ellos, el *cluster 4* presentaba NCRs con expresión alta en los nódulos a 10 dpi independientemente del rizobio que infectaba la planta. La ausencia de genes del *cluster 4* con expresión diferencial entre nódulos de LPU83 y Sm2011 nos sugeriría que estos NCRs no son esenciales para la diferenciación de los bacteroides (Tabla A28). Podrían, sin embargo, estar involucrados en procesos tempranos de desarrollo del nódulo. Por otro lado, identificamos tres *clusters* con aproximadamente 500 NCRs con un claro contraste en su expresión entre nódulos eficientes e ineficientes, confirmando la importancia de estos genes en la diferenciación de los bacteroides y la formación de un nódulo eficiente. Los NCRs se expresan dentro de los nódulos eficientes e ineficientes (Figura VII.1). Sin embargo, es evidente la alteración de los perfiles de expresión entre cepas eficientes e ineficientes, por lo que esto mismo podría ser una de las causas de la falla en la diferenciación. Nuestros resultados apoyan la hipótesis postulada por Pan *et al.* (2017) que sostiene que el balance preciso de estos péptidos puede ser clave en la FBN eficiente.

Particularmente, el NCR247 ha sido estudiado en profundidad y se encuentra involucrado en el cese de la división celular bacteriana (Farkas *et al.*, 2014), disminuyendo la expresión del regulador del ciclo celular bacteriano *ctrA* (Penterman *et*

al., 2014). Este péptido no presenta diferencias en la expresión entre nódulos eficientes e ineficientes en las condiciones que analizamos (Tabla VII.2). Sin embargo, la expresión del regulador bacteriano *ctrA* disminuye tanto en bacteroides de Sm2011 como en aquellos de LPU83 a 31 dpi (Tabla V.1). Esto nos indicaría que la falla en la respuesta a NCRs de LPU83 no involucraría la expresión del NCR247, al menos en cuanto a la disminución en la expresión de los genes evaluados en los bacteroides. Este gen pertenece al *cluster* 4, que no presenta diferencias entre nódulos eficientes e ineficientes, y se ha demostrado que su expresión se da principalmente en la zona II y la interzona II-III (Farkas *et al.*, 2014). Debido a esto se puede suponer que la falla en la diferenciación comienza a partir de la interzona II-III, donde se expresan otros NCRs evaluados: NCR086, NCR169, NCR343 y NCR-new35 (Tabla VII.2). Llamativamente, estos genes pertenecen todos al *cluster* 2 en el análisis realizado en esta tesis, mientras que en el trabajo de Roux *et al.* (2014) pertenecen al *cluster* 9 de genes con patrón de expresión similar en el nódulo. La concordancia entre los genes identificados del *cluster* 2 en el análisis de esta tesis y los del *cluster* 9 del trabajo de Roux *et al.* (2014) podría sugerirnos que otros NCRs que compartan dichos *cluster* serían esenciales en la FBN. Como se muestra en la tabla VII.2, la expresión de estos NCRs aumenta en los nódulos de LPU83 a 31 dpi. Sin embargo, los valores de lecturas normalizadas de la mayoría de ellos siguen siendo menores a lo observado en nódulos de Sm2011. Esto podría afectar el fenotipo simbiótico debido a una menor concentración de NCRs en los nódulos. A su vez, ha sido descrita la presencia de peptidasas que degradan péptidos NCRs generando fenotipos ineficientes en la FBN (Price *et al.*, 2015, Ghosh & Chakraborty, 2024). Esto indica que se necesita un nivel de NCRs basal para su correcta funcionalidad.

Los resultados que obtuvimos demuestran que la expresión de los NCRs no es nula en los nódulos ineficientes, sino menor a la de nódulos eficientes para la mayoría de los NCRs estudiados. Teniendo en cuenta que la expresión de varios de estos péptidos aumenta a 31 dpi en los nódulos de LPU83, la falla también podría deberse a un retardo temporal en la expresión genética de los NCRs. Por otro lado, se ha descrito que estos péptidos pueden controlar la especificidad de huésped, como se observa para los NCRs NFS1 y NFS2. Estos genes inducen la senescencia de los nódulos ineficientes en la FBN de *M. truncatula* A17 infectada por *S. meliloti* Rm41, sin embargo, otras cepas de *S. meliloti* son capaces de nodular esta planta eficientemente (Wang *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2017). La expresión de estos genes no tiene diferencias entre los nódulos eficientes e ineficientes estudiados en este trabajo. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad que genes con función homóloga se encuentren realizando esta función de controlar la compatibilidad entre *M. truncatula* y los rizobios que infectan la planta.

S. meliloti necesita del plásmido simbiótico, pSymA, para el correcto desarrollo del nódulo. Sin embargo, también posee otros elementos extracromosomales que pueden alterar la correcta evolución en la formación de este órgano (Crook *et al.*, 2012). Más específicamente, se ha descrito una peptidasa, HrrP, codificada en un plásmido accesorio que interfiere con el desarrollo del nódulo (Price *et al.*, 2015). Por otro lado, mientras se desarrollaba esta tesis doctoral, se describió SapA, una peptidasa presente en el genoma de distintas cepas de *S. meliloti* (Benedict *et al.*, 2021). En dicho trabajo, se sobreexpresaron diversas peptidasas dentro de los bacteroides y se observó si alteraban el fenotipo simbiótico mediante cambios en el crecimiento de la planta y el desarrollo de los nódulos. Debido a que, si bien reducida, existe expresión de los NCRs en los nódulos de LPU83, la expresión de peptidasas que degraden estos péptidos podría disminuir aún más la cantidad de NCRs en los bacteroides. Consecuentemente, esto podría influir en la diferenciación de las bacterias al no permitir que estos péptidos alcancen la concentración necesaria, característica esencial para la diferenciación (Mergaert *et al.*, 2006, Penterman *et al.*, 2014, Horvath *et al.*, 2023). Debido a esto, decidimos buscar y estudiar peptidasas ortólogas a las descritas para *S. meliloti* en el genoma de *R. favelukesii* LPU83. Recientemente, y a la par de nuestros ensayos, se ha descrito la presencia de peptidasas homólogas a HrrP (Price *et al.*, 2015) y a SapA (Benedict *et al.*, 2021) en el aislamiento de *Rhizobium favelukesii* ORY1, obtenido de nódulos de alfalfa en suelos ácidos de Uruguay (Morel Revetria *et al.*, 2023). La presencia de genes homólogos a las peptidasas y el fenotipo parasítico de estos aislamientos llevó a los autores a hipotetizar que estas proteínas podrían estar involucradas en dicho fenotipo.

La proteína HrrP de *S. meliloti* presenta un dominio peptidasa perteneciente a la superfamilia PqqL y dos dominios M16C inactivos. En LPU83 detectamos dos genes homólogos a HrrP que forman un operón (Tabla VII.4). Determinamos en el primer gen un dominio peptidasa M16 y un dominio estructural M16C y, en el gen río abajo, encontramos otro dominio estructural M16C (Figura VII.2). Esta diferencia que se presenta puede deberse a una mutación en el marco de lectura del gen que llevó a que la proteína original se divida en dos genes. Otra explicación a esta diferencia estructural podría deberse a que esta estructura sea ancestral a la formación de HrrP completa y que una mutación posterior haya fusionado ambos dominios en una única proteína. Para el caso de la proteína homóloga a SapA, en LPU83 detectamos un homólogo con los mismos dominios que aquella presente en *S. meliloti* 1021: un dominio M16 funcional y un dominio M16C inactivo (Figura VII.2).

Respecto a la transcripción de los genes ortólogos a *hrrP* en los bacteroides de LPU83 en *M. truncatula* A17 (Tabla VII.3), observamos que su expresión se induce en

los mismos, similar a los descrito para *hrrP* (Price *et al.*, 2015). La mutación de las peptidasas en la cepa parental LPU83 no generó cambios en el crecimiento de las plantas, indicando que estas no estarían implicadas en el fenotipo simbiótico de la cepa en *M. truncatula* A20 (Figura VII.3). La construcción de plásmidos que permitieron sobreexpresar las peptidasas pertenecientes a LPU83 nos permitió analizar su rol en la simbiosis de *S. meliloti*. Sin embargo, ninguna de ellas mostró cambios en el fenotipo, sugiriendo que su actividad no es comparable con HrrP y SapA (Figura VII.4). De esta manera, demostramos que las peptidasas de LPU83 no tienen la misma función o, al menos, no estarían involucradas en el proceso simbiótico. Cabe destacar que al utilizar como controles de los ensayos a HrrP y a SapA, detectamos que la sobreexpresión de HrrP altera drásticamente el fenotipo en la planta, repitiendo el fenotipo descrito previamente (Price *et al.*, 2015), pero la sobreexpresión de SapA (*S. meliloti* C307 (pPG068)) en nuestros ensayos no mostró diferencias con la cepa control de *S. meliloti* en las tres réplicas realizadas (Figura VII.4), fenotipo diferente al descrito por Benedict *et al.* (2021). Por lo tanto, si bien el fenotipo de las peptidasas de LPU83 no sería tan drástico como HrrP, no se puede descartar totalmente la posibilidad de que las peptidasas de LPU83 alterasen en algún nivel el desarrollo del nódulo eficiente.

Este trabajo de tesis doctoral permitió la caracterización fenotípica detallada del desarrollo de nódulos eficientes e ineficientes en la FBN. Para ello, realizamos ensayos en plantas, caracterizaciones histológicas y microbiológicas que nos permitieron determinar que *R. favelukesii* es una buena especie modelo para realizar ensayos comparativos y aportar conocimiento sobre las diferencias moleculares y fenotípicas de la relación entre rizobios eficientes e ineficientes durante la simbiosis con *Medicago* spp. Mediante transcriptómica dual, logramos establecer conjuntos de genes, tanto en la planta como en las bacterias, con una elevada probabilidad de estar involucrados en etapas claves de la simbiosis y, más específicamente, de determinantes que podrían estar involucrados en la diferenciación de bacterias en bacteroides.

VIII.2. Perspectivas

El auge de las ómicas (en especial transcriptómica y proteómica) ha permitido la realización de estudios masivos que muestran un panorama más completo de diversos procesos celulares. Sin embargo, sucede a menudo que estas metodologías no permiten comprender qué genes son los responsables de un fenotipo ni cómo lo hacen. Asimismo, debido a la masividad de estas técnicas, un gran número de los genes detectados corresponden a genes con funciones desconocidas, lo que dificulta dilucidar su rol en el proceso.

La utilización de *S. meliloti* 2011 y *R. favelukesii* LPU83 como ejemplos de un desarrollo eficiente e ineficiente del nódulo, respectivamente, nos ha permitido identificar numerosos genes expresados diferencialmente tanto en la planta como en la bacteria, generando el interrogante de cuáles cumplirían un rol definido en el proceso simbiótico y cómo lo harían. Mediante experimentos que complementen nuestros resultados de transcriptómica dual, como por ejemplo proteómica y metabolómica de nódulos ineficientes o eficientes en la FBN, y ensayos de biología molecular, esperamos poder entender mejor el proceso de diferenciación de las bacterias en bacteroides dentro del nódulo y definir genes necesarios para una diferenciación completa. Estos genes podrían ser blancos para el desarrollo de marcadores moleculares que permitan identificar nuevas cepas nativas con potencial en la FBN eficiente.

La comprensión más detallada del proceso simbiótico y la utilización de dicho conocimiento para optimizar el uso de estas bacterias como inoculantes permitirán extender los límites de una agricultura sustentable.

Anexo



Las tablas del presente anexo se encuentran en el siguiente link:

https://biolunlpeducar-my.sharepoint.com/:f/g/personal/aluchetti_biol_unlp_edu_ar/EqZmlQcOraJCux2sg-G2zCgBolQzDdvAzkJuShh_3ZA5zw

Índice de tablas del anexo

- Tablas de genes de *Medicago truncatula* diferencialmente expresados.

Tabla A1. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de LPU83 contra nódulos de Sme2011 a 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de LPU83 y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sme2011.

Tabla A2. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de LPU83 contra nódulos de Sme2011 a 31 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de LPU83 y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sme2011.

Tabla A3. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de LPU83 contra nódulos de Sma818B a 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de LPU83 y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sma818B.

Tabla A4. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de LPU83 contra nódulos de Sma818B a 31 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de LPU83 y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sma818B.

Tabla A5. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de Sma818B contra nódulos de Sme2011 a 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sma818B y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sme2011.

Tabla A6. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de Sma818B contra nódulos de Sme2011 a 31 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sma818B y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos de Sme2011.

Tabla A7. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de LPU83 a 31 dpi contra 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos 31 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos 10 dpi.

Tabla A8. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de Sme2011 a 31 dpi contra 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos 31 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos 10 dpi.

Tabla A9. Lista de GEDs de *M. truncatula* para la comparación nódulos de Sma818B a 31 dpi contra 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en nódulos 31 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en nódulos 10 dpi.

Tabla A10. Lista de genes compartidos que representan la respuesta general al desarrollo del nódulo. GEDs con mayor expresión a 10 dpi.

Tabla A11. Lista de genes compartidos que representan la respuesta general al desarrollo del nódulo. GEDs con mayor expresión a 31 dpi.

Tabla A12. Lista de genes compartidos que representan respuesta a nódulos eficientes. GEDs con mayor expresión a 10 dpi en nódulos de Sm2011.

Tabla A13. Lista de genes compartidos que representan respuesta a nódulos eficientes. GEDs con mayor expresión a 31 dpi en nódulos de Sm2011.

Tabla A14. Lista de genes compartidos que representan respuesta a nódulos ineficientes. GEDs con mayor expresión a 10 dpi en nódulos de LPU83 y Sma818B.

Tabla A15. Lista de genes compartidos que representan respuesta a nódulos ineficientes. GEDs con mayor expresión a 31 dpi en nódulos de LPU83 y Sma818B.

Tabla A16. Lista de genes asociados a senescencia y su expresión en los nódulos de *M. truncatula* analizados en esta tesis doctoral.

- Tablas de genes de *Rhizobium favelukesii* LPU83 diferencialmente expresados:

Tabla A17. Lista de GEDs de *R. favelukesii* LPU83 para la comparación bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A18. Lista de GEDs de *R. favelukesii* LPU83 para la comparación bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A19. Lista de GEDs de *R. favelukesii* LPU83 para la comparación bacteroides 31 dpi contra bacteroides 31 dpi. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 31 dpi.

- Tablas de genes de *Sinorhizobium meliloti* 2011 diferencialmente expresados:

Tabla A20. Lista de GEDs de *S. meliloti* 2011 para la comparación bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} <-1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A21. Lista de GEDs de *S. meliloti* 2011 para la comparación bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} >1,5$ indican mayor expresión en

bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A22. Lista de GEDs de *S. meliloti* 2011 para la comparación bacteroides 31 dpi contra bacteroides 31 dpi. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 31 dpi.

- Tablas de genes ortólogos entre LPU83 y Sm2011 con patrones de expresión definidos en la sección IV.4.3 del capítulo VI.

Tabla A23. Lista de genes ortólogos con igual tendencia para la comparación de bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A24. Lista de genes ortólogos con igual tendencia para la comparación de bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 31 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A25. Lista de genes ortólogos con igual tendencia para la comparación de bacteroides 31 dpi contra bacteroides 10 dpi. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 31 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi.

Tabla A26. Lista de genes ortólogos con tendencia inversa para la comparación de bacteroides 10 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

Tabla A27. Lista de genes ortólogos con tendencia inversa para la comparación de bacteroides 31 dpi contra bacterias en vida libre. $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ indican mayor expresión en bacteroides 10 dpi y $\log_2\text{FoldChange} < -1,5$ indican mayor expresión en bacterias en vida libre.

- Capítulo VII

Tabla A28. Lista de NCRs estudiados, *cluster* que pertenecen y su expresión.

Tabla A29. Proteínas diferencialmente expresadas en la proteómica en vida libre para LPU83 y las cepas mutantes en las peptidasas. Valores de $\log_2\text{FoldChange}$ positivos indican una mayor expresión en LPU83 y valores negativos una mayor expresión en la cepa mutante (todas con un p-valor < 0.05).

Bibliografía



- Abramovitch RB, Anderson JC & Martin GB (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 601-611.
- Alexeyev MF, Shokolenko IN & Croughan TP (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67.
- Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C & Montrichard F (2008) A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol* **148**: 424-435.
- Ardourel M, Demont N, Debelle F, Maillat F, de Billy F, Promé J-C, Dénarié J & Truchet G (1994) *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**: 1357-1374.
- Ashburner M, Ball CA & Blake JA (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*.
- Astudillo-García C, Bell JJ, Webster NS, Glasl B, Jompa J, Montoya JM & Taylor MW (2017) Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation. *Environ Microbiol* **19**: 1450-1462.
- Baev N, Endre G, Petrovics G, Banfalvi Z & Kondorosi A (1991) Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: nodM codes for D-glucosamine synthetase. *Mol Gen Genet* **228**: 113-124.
- Baev N, Schultze M, Barlier I, Ha DC, Virelizier H, Kondorosi E & Kondorosi A (1992) *Rhizobium* nodM and nodN genes are common nod genes: nodM encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. *J Bacteriol* **174**: 7555-7565.
- Baier MC, Barsch A, Kuster H & Hohnjec N (2007) Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiol* **145**: 1600-1618.
- Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC & Béna G (2007) Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol* **189**: 5223-5236.
- Barnett, Melanie J, Fisher & Robert F (2006) Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis* **42**: 24.
- Barsch A, Tellstrom V, Patschkowski T, Kuster H & Niehaus K (2006) Metabolite profiles of nodulated alfalfa plants indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 998-1013.
- Basile LA & Lepek VC (2021) Legume-rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved? *Microbial biotechnology* **14**: 1897-1917.
- Becker A, Ruberg S, Baumgarth B, Bertram-Drogatz PA, Quester I & Puhler A (2002) Regulation of succinoglycan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 187-190.
- Becker AB & Roth RA (1992) An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3835-3839.
- Benedict AB, Ghosh P, Scott SM & Griffiths JS (2021) A conserved rhizobial peptidase that interacts with host-derived symbiotic peptides. *Sci Rep* **11**: 11779.
- Benmrid B, Ghoulam C, Zeroual Y, Kouisni L & Bargaz A (2023) Bioinoculants as a means of increasing crop tolerance to drought and phosphorus deficiency in legume-cereal intercropping systems. *Communications biology* **6**: 1016.
- Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Bittner AN, Foltz A & Oke V (2007) Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**: 1884-1889.
- Blom J, Kreis J, Spanig S, Juhre T, Bertelli C, Ernst C & Goesmann A (2016) EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Res*.
- Blondon F, Marie D, Brown S & Kondorosi A (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* **37**: 264-270.
- Bourcy M, Brocard L, Pislariu CI, Cosson V, Mergaert P, Tadege M, Mysore KS, Udvardi MK, Gourion B & Ratet P (2013) *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. *New Phytol* **197**: 1250-1261.

- Brom S, García de los Santos A, Stepkowsky T, Flores M, Dávila G, Romero D & Palacios R (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* **174**: 5183-5189.
- Caetano-Anolles G & Bauer WD (1988) Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Planta* **175**: 546-557.
- Cai J, Zhang LY, Liu W, *et al.* (2018) Role of the Nod Factor Hydrolase MtNFH1 in Regulating Nod Factor Levels during Rhizobial Infection and in Mature Nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **30**: 397-414.
- Capela D, Filipe C, Bobik C, Batut J & Bruand C (2006) *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 363-372.
- Carlson RW, Reuhs B, Chen TB, Bhat UR & Noel KD (1995) Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. *J Biol Chem* **270**: 11783-11788.
- Castellani LG, Nilsson JF, Wibberg D, Schluter A, Puhler A, Brom S, Pistorio M & Torres Tejerizo G (2019) Insight into the structure, function and conjugative transfer of pLPU83a, an accessory plasmid of *Rhizobium favelukesii* LPU83. *Plasmid* **103**: 9-16.
- Castellani LG, Luchetti A, Nilsson JF, *et al.* (2021) Exopolysaccharide characterization of *Rhizobium favelukesii* LPU83 and its role in the symbiosis with alfalfa. *Front Plant Sci* **12**: 642576.
- Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Olah B, Roudier F, Kondorosi A & Kondorosi E (1999) The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J* **18**: 4476-4484.
- Cerri MR, Wang Q, Stolz P, *et al.* (2017) The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytol* **215**: 323-337.
- Ciampitti IA, de Borja Reis AF, Cordova SC, Castellano MJ, Archontoulis SV, Correndo AA, Antunes De Almeida LF & Moro Rosso LH (2021) Revisiting Biological Nitrogen Fixation Dynamics in Soybeans. *Front Plant Sci* **12**: 727021.
- Cole BJ, Feltcher ME, Waters RJ, *et al.* (2017) Genome-wide identification of bacterial plant colonization genes. *PLoS Biol* **15**: e2002860.
- Collinge DB, Jensen DF, Rabiey M, Sarrocco S, Shaw MW & Shaw RH (2022) Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology* **71**: 1024-1047.
- Combier JP, de Billy F, Gamas P, Niebel A & Rivas S (2008) Trans-regulation of the expression of the transcription factor MthAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev* **22**: 1549-1559.
- Combier JP, Frugier F, de Billy F, *et al.* (2006) MthAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* **20**: 3084-3088.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H & Sessitsch A (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol* **62**: 188-197.
- Compant S, Cassan F, Kostic T, Johnson L, Brader G, Trognitz F & Sessitsch A (2024) Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production. *Nat Rev Microbiol*.
- Crook MB, Lindsay DP, Biggs MB, Bentley JS, Price JC, Clement SC, Clement MJ, Long SR & Griffiths JS (2012) Rhizobial plasmids that cause impaired symbiotic nitrogen fixation and enhanced host invasion. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 1026-1033.
- Charpentier M & Oldroyd GE (2013) Nuclear calcium signaling in plants. *Plant Physiol* **163**: 496-503.
- Checucci A, DiCenzo GC, Bazzicalupo M & Mengoni A (2017) Trade, Diplomacy, and Warfare: The Quest for Elite Rhizobia Inoculant Strains. *Front Microbiol* **8**: 2207.
- Cheng HP & Walker GC (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**: 5183-5191.
- D'Haese W & Holsters M (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79R-105R.
- de Borja Reis AF, Moro Rosso L, Purcell LC, Naeve S, Casteel SN, Kovacs P, Archontoulis S, Davidson D & Ciampitti IA (2021) Environmental Factors Associated With Nitrogen Fixation Prediction in Soybean. *Front Plant Sci* **12**: 675410.

- De Nisco NJ, Abo RP, Wu CM, Penterman J & Walker GC (2014) Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 3217-3224.
- de Zelicourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M, Zahaf O, Crespi M, Gruber V & Frugier F (2012) Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant J* **70**: 220-230.
- Del Papa MF, Balagué LJ, Sowinski SC, *et al.* (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1420-1427.
- Del Papa MF, Pistorio M, Draghi WO, *et al.* (2007) Identification and characterization of a *nodH* ortholog from the alfalfa-nodulating Or191-like rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 138-145.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C & Vorholt JA (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16428-16433.
- Dell'Olmo E, Tiberini A & Sigillo L (2023) Leguminous Seedborne Pathogens: Seed Health and Sustainable Crop Management. *Plants (Basel)* **12**.
- Derrien M & Veiga P (2017) Rethinking Diet to Aid Human-Microbe Symbiosis. *Trends Microbiol* **25**: 100-112.
- diCenzo G, Milunovic B, Cheng J & Finan TM (2013) The tRNA^{arg} gene and *engA* are essential genes on the 1.7-Mb pSymB megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain. *J Bacteriol* **195**: 202-212.
- diCenzo GC, Zamani M, Milunovic B & Finan TM (2016) Genomic resources for identification of the minimal N₂-fixing symbiotic genome. *Environmental Microbiology* **18**: 2534-2547.
- diCenzo GC, Zamani M, Ludwig HN & Finan TM (2017) Heterologous Complementation Reveals a Specialized Activity for BacA in the *Medicago-Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **30**: 312-324.
- Dickstein R, Scheirer DC, Fowle WH & Ausubel FM (1991) Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants are arrested at an early stage of development. *Mol Gen Genet* **230**: 423-432.
- Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621-631.
- Doyle JJ & Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900-910.
- Duke J (1983) *Handbook of Energy Crops*. Published only on the Internet, .
- Durgo H, Klement E, Hunyadi-Gulyas E, Szucs A, Kereszt A, Medzihradzsky KF & Kondorosi E (2015) Identification of nodule-specific cysteine-rich plant peptides in endosymbiotic bacteria. *Proteomics* **15**: 2291-2295.
- Dutta A, Trivedi A, Nath CP, Gupta DS & Hazra KK (2022) A comprehensive review on grain legumes as climate-smart crops: Challenges and prospects. *Environmental Challenges* **7**: 100479.
- Eardly BD, Hannaway DB & Bottomley PJ (1985) Characterization of Rhizobia from Ineffective Alfalfa Nodules: Ability to Nodulate Bean Plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.]. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1422-1427.
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Farkas A, Maroti G, Durgo H, Gyorgypal Z, Lima RM, Medzihradzsky KF, Kereszt A, Mergaert P & Kondorosi E (2014) *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5183-5188.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE & Gresshoff PM (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61-76.
- Fischer HM (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.
- Frayse N, Couderc F & Poinso V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365-1380.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.

- Galperin MY, Wolf YI, Makarova KS, Vera Alvarez R, Landsman D & Koonin EV (2021) COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Res* **49**: D274-D281.
- Gallego-Giraldo L, Jikumaru Y, Kamiya Y, Tang Y & Dixon RA (2011) Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *New Phytol* **190**: 627-639.
- Gautrat P, Mortier V, Laffont C, De Keyser A, Fromentin J, Frugier F & Goormachtig S (2019) Unraveling new molecular players involved in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **70**: 1407-1417.
- Ge S.X., Jung D. & R. Y (2019) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *bioinformatics*.
- Geddes BA, Kearsley JVS, Huang J, Zamani M, Muhammed Z, Sather L, Panchal AK, diCenzo GC & Finan TM (2021) Minimal gene set from *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti* pSymA required for efficient symbiosis with *Medicago*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Geddes BAK, J. V. S., Huang J, Zamani M, Muhammed Z, Sather L, Panchal AK, diCenzo GC & Finan TM (2020) Minimal gene set from *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti* pSymA required for efficient symbiosis with *Medicago*. *PNAS*.
- Ghosh P & Chakraborty J (2024) Exploring the role of symbiotic modifier peptidases in the legume - *Rhizobium* symbiosis. *Arch Microbiol* **206**: 147.
- Gibson KE, Kobayashi H & Walker GC (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* **42**: 413-441.
- Glazebrook J, Ichige A & Walker GC (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev* **7**: 1485-1497.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M & Frugier F (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**: 2680-2693.
- Guefrachi I, Nagymihaly M, Pislariu CI, Van de Velde W, Ratet P, Mars M, Udvardi MK, Kondorosi E, Mergaert P & Alunni B (2014) Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 712.
- Haag AF, Baloban M, Sani M, *et al.* (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* **9**: e1001169.
- Hakoyama T, Niimi K, Watanabe H, *et al.* (2009) Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. *Nature* **462**: 514-517.
- Harrison PW, Lower RP, Kim NK & Young JP (2010) Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* **18**: 141-148.
- Haskett T, Wang P, Ramsay J, O'Hara G, Reeve W, Howieson J & Terpolilli J (2016) Complete Genome Sequence of *Mesorhizobium ciceri* Strain CC1192, an Efficient Nitrogen-Fixing Microsymbiont of *Cicer arietinum*. *Genome Announc* **4**.
- Hendrickson H, Islam M, Wabo GF & Mafu S (2024) Biochemical analysis of the TPS-a subfamily in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* **15**: 1349009.
- Herigstad Becky HM, Heersink Joanna (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*.
- Hilker R, Stadermann KB, Doppmeier D, Kalinowski J, Stoye J, Straube J, Winnebald J & Goesmann A (2014) ReadXplorer--visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics* **30**: 2247-2254.
- Hirsch S, Kim J, Munoz A, Heckmann AB, Downie JA & Oldroyd GE (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**: 545-557.
- Horvath B, Domonkos A, Kereszt A, *et al.* (2015) Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* *dnf7* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 15232-15237.
- Horvath B, Gungor B, Toth M, *et al.* (2023) The *Medicago truncatula* nodule-specific cysteine-rich peptides, NCR343 and NCR-new35 are required for the maintenance of rhizobia in nitrogen-fixing nodules. *New Phytol* **239**: 1974-1988.
- Horvath B, Gungor B, Toth M, *et al.* (2023) The *Medicago truncatula* nodule-specific cysteine-rich peptides, NCR343 and NCR-new35 are required for the maintenance of rhizobia in nitrogen-fixing nodules. *The New phytologist*.

- Hynes MF, Simon R & Pühler A (1985) The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* **13**: 99-105.
- Ibanez F, Wall L & Fabra A (2017) Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *J Exp Bot* **68**: 1905-1918.
- INTA (2022) Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina. *Ediciones INTA*.
- Jardinaud MF, Boivin S, Rodde N, *et al.* (2016) A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiol* **171**: 2256-2276.
- Jiang S, Jardinaud MF, Gao J, *et al.* (2021) NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules. *Science* **374**: 625-628.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A & Sato S (2011) Complete Genome Sequence of the Soybean Symbiont Bradyrhizobium japonicum Strain USDA6T. *Genes (Basel)* **2**: 763-787.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, *et al.* (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**: 189-197.
- Karunakaran R, Ramachandran VK, Seaman JC, East AK, Mouhsine B, Mauchline TH, Prell J, Skeffington A & Poole PS (2009) Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *J Bacteriol* **191**: 4002-4014.
- Karunakaran R, Haag AF, East AK, Ramachandran VK, Prell J, James EK, Scocchi M, Ferguson GP & Poole PS (2010) BacA is essential for bacteroid development in nodules of galeoid, but not phaseoloid, legumes. *J Bacteriol* **192**: 2920-2928.
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, *et al.* (2015) Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* **523**: 308-312.
- Kessler B, de Lorenzo V & Timmis KN (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Kim M, Chen Y, Xi J, Waters C, Chen R & Wang D (2015) An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 15238-15243.
- Kondorosi E, Mergaert P & Kereszt A (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* **67**: 611-628.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krajinski F & Frenzel A (2007) Towards the elucidation of AM-specific transcription in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **68**: 75-81.
- Krasny L & Huang PH (2021) Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology. *Molecular omics* **17**: 29-42.
- Kumar V, Rawat AK & Rao DLN (2022) Improving the Performance of Bradyrhizobium japonicum by Double Inoculation in Non-Fertilized and Fertilized Wheat–Soybean Rotation. *Agricultural Research* **11**: 683-693.
- Lagares A, Sanjuán J & Pistorio M (2015) The Plasmid Mobilome of the Model Plant-Symbiont *Sinorhizobium meliloti*: Coming up with New Questions and Answers. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, p. ^pp. American Society of Microbiology.
- Lagares A, Caetano-Anolles G, Niehaus K, Lorenzen J, Ljunggren HD, Puhler A & Favelukes G (1992) A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J Bacteriol* **174**: 5941-5952.
- Lamouche F, Gully D, Chaumeret A, *et al.* (2018) Transcriptomic dissection of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 in symbiosis with *Aeschynomene* spp. inducing different bacteroid morphotypes with contrasted symbiotic efficiency. *Environ Microbiol*.
- Lang C & Long SR (2015) Transcriptomic Analysis of *Sinorhizobium meliloti* and *Medicago truncatula* Symbiosis Using Nitrogen Fixation-Deficient Nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 856-868.
- Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357-359.

- Laporte P, Lepage A, Fournier J, *et al.* (2014) The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* **65**: 481-494.
- Larkcom J (1980) *Salads all the Year Round*. Hamlyn, .
- Laus MC, van Brussel AA & Kijne JW (2005) Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1123-1129.
- Leigh JA, Signer ER & Walker GC (1985) Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 6231-6235.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillat F, Truchet G, Promé J-C & Dénarié J (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.
- Levy A, Salas Gonzalez I, Mittelviefhaus M, *et al.* (2017) Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nat Genet* **50**: 138-150.
- Limpens E, van Zeijl A & Geurts R (2015) Lipochitooligosaccharides Modulate Plant Host Immunity to Enable Endosymbioses. *Annual review of phytopathology* **53**: 311-334.
- Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T & Geurts R (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10375-10380.
- Liu Z, Beskrovnaya P, Melnyk RA, Hossain SS, Khorasani S, O'Sullivan LR, Wiesmann CL, Bush J, Richard JD & Haney CH (2018) A Genome-Wide Screen Identifies Genes in Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* Required to Evade Plant Defenses. *mBio* **9**.
- Long SR (1996) *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885-1898.
- Lopez-Fuentes E, Torres-Tejerizo G, Cervantes L & Brom S (2014) Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative transfer region of plasmid pRet42a from *Rhizobium etli* CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. *Front Microbiol* **5**: 793.
- Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**.
- Malolepszy A, Kelly S, Sorensen KK, *et al.* (2018) A plant chitinase controls cortical infection thread progression and nitrogen-fixing symbiosis. *Elife* **7**.
- Man Ha C, Fine D, Bhatia A, Rao X, Martin MZ, Engle NL, Wherritt DJ, Tschaplinski TJ, Sumner LW & Dixon RA (2019) Ectopic Defense Gene Expression Is Associated with Growth Defects in *Medicago truncatula* Lignin Pathway Mutants. *Plant Physiol* **181**: 63-84.
- Marlow VL, Haag AF, Kobayashi H, Fletcher V, Scocchi M, Walker GC & Ferguson GP (2009) Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **191**: 1519-1527.
- Maroti G & Kondorosi E (2014) Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front Microbiol* **5**: 326.
- Marx H, Minogue CE, Jayaraman D, *et al.* (2016) A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nature Biotechnology* **34**: 1198-1205.
- Mathesius U (2022) Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. *J Plant Physiol* **276**: 153765.
- Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, *et al.* (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS ONE* **5**: e9519.
- Mei P-P, Wang P, Yang H, Gui L-G, Christie P & Li L (2021) Maize/faba bean intercropping with rhizobial inoculation in a reclaimed desert soil enhances productivity and symbiotic N₂ fixation and reduces apparent N losses. *Soil and Tillage Research* **213**: 105154.
- Mergaert P, Kereszt A & Kondorosi E (2020) Gene Expression in Nitrogen-Fixing Symbiotic Nodule Cells in *Medicago truncatula* and Other Nodulating Plants. *Plant Cell* **32**: 42-68.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A & Kondorosi E (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* **132**: 161-173.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, *et al.* (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5230-5235.

- Mikulass KR, Nagy K, Bogos B, Szegletes Z, Kovacs E, Farkas A, Varo G, Kondorosi E & Kereszt A (2016) Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides disturb the integrity of bacterial outer and inner membranes and cause loss of membrane potential. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **15**: 43.
- Mithofer A (2002) Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci* **7**: 440-444.
- Miyata K, Hayafune M, Kobae Y, Kaku H, Nishizawa Y, Masuda Y, Shibuya N & Nakagawa T (2016) Evaluation of the Role of the LysM Receptor-Like Kinase, OsNFR5/OsRLK2 for AM Symbiosis in Rice. *Plant Cell Physiol* **57**: 2283-2290.
- Montiel J, Szucs A, Boboescu IZ, Gherman VD, Kondorosi E & Kereszt A (2016) Terminal Bacteroid Differentiation Is Associated With Variable Morphological Changes in Legume Species Belonging to the Inverted Repeat-Lacking Clade. *Mol Plant Microbe Interact* **29**: 210-219.
- Montiel J, Downie JA, Farkas A, Bihari P, Herczeg R, Bálint B, Mergaert P, Kereszt A & Kondorosi É (2017) Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 5041-5046.
- Morel Revetria MA, Berais-Rubio A, Gimenez M, Sanjuan J, Signorelli S & Monza J (2023) Competitiveness and Phylogenetic Relationship of Rhizobial Strains with Different Symbiotic Efficiency in *Trifolium repens*: Conversion of Parasitic into Non-Parasitic Rhizobia by Natural Symbiotic Gene Transfer. *Biology* **12**.
- Mosier AR (2001) Exchange of gaseous nitrogen compounds between agricultural systems and the atmosphere. *Plant and Soil* **228**: 17-27.
- Niehaus K & Becker A (1998) The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem* **29**: 73-116.
- Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Perez-Gimenez J, Torres Tejerizo GA & Pistorio M (2019) Proteomic analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to rcd stress. *J Proteome Res* **18**: 3615-3629.
- Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, *et al.* (2020) Global transcriptome analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress. *FEMS Microbiol Ecol* **97**.
- Oldroyd GE & Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519-546.
- Ormeño-Orrillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, González V, Peralta H, Mora J, Martínez-Romero J & Martínez-Romero E (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology* **38**: 287-291.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P & Udvardi MK (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**: 531-535.
- Pan H & Wang D (2017) Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis. *Nat Plants* **3**: 17048.
- Peck MC, Fisher RF & Long SR (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 5417-5427.
- Pecrix Y, Staton SE, Sallet E, *et al.* (2018) Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nat Plants* **4**: 1017-1025.
- Pellock BJ, Cheng HP & Walker GC (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* **182**: 4310-4318.
- Penmetsa RV & Cook DR (2000) Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **123**: 1387-1398.
- Penmetsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR & Cook DR (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131**: 998-1008.
- Penterman J, Abo RP, De Nisco NJ, Arnold MFF, Longhi R, Zanda M & Walker GC (2014) Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 3561-3566.
- Pereira WJ, Boyd J, Conde D, *et al.* (2024) The single-cell transcriptome program of nodule development cellular lineages in *Medicago truncatula*. *Cell Rep* **43**: 113747.
- Perez Guerra JC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, Van De Velde W, Goormachtig S & Holsters M (2010) Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **152**: 1574-1584.

- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201.
- Peters NK, Frost JW & Long SR (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**: 977-980.
- Pierre O, Hopkins J, Combiér M, Baldacci F, Engler G, Brouquisse R, Herouart D & Boncompagni E (2014) Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol* **202**: 849-863.
- Pistorio M, Del Papa MF, Balagué LJ & Lagares A (2003) Identification of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by conjugative helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 15-21.
- Poole P & Allaway D (2000) Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Advances in microbial physiology* **43**: 117-163.
- Poole P, Ramachandran V & Terpolilli J (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*.
- Porter SS, Dupin SE, Denison RF, Kiers ET & Sachs JL (2024) Host-imposed control mechanisms in legume-rhizobia symbiosis. *Nature microbiology* **9**: 1929-1939.
- Price PA, Tanner HR, Dillon BA, Shabab M, Walker GC & Griffiths JS (2015) Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 15244-15249.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Jurkiewicz A, Fukai E, Quistgaard EM, Albrektsen AS, James EK, Thirup S & Stougaard J (2007) LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* **26**: 3923-3935.
- Ramirez-Romero MA, Soberon N, Perez-Oseguera A, Tellez-Sosa J & Cevallos MA (2000) Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *J Bacteriol* **182**: 3117-3124.
- Ramsay JP, Sullivan JT, Stuart GS, Lamont IL & Ronson CW (2006) Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol Microbiol* **62**: 723-734.
- Ribeiro CW, Baldacci-Cresp F, Pierre O, *et al.* (2017) Regulation of Differentiation of Nitrogen-Fixing Bacteria by Microsymbiont Targeting of Plant Thioredoxin s1. *Curr Biol* **27**: 250-256.
- Ripodas C, Castaingts M, Clua J, Villafane J, Blanco FA & Zanetti ME (2019) The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 Subunits of the Heterotrimeric NF-Y Transcription Factor Influence Strain Preference in the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli* Symbiosis. *Front Plant Sci* **10**: 221.
- Robertson GP & Vitousek PM (2009) Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environment and Resources* **34**: 97-125.
- Roche P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J & Promé J-C (1991) Molecular basis of symbiotic host specificity in *rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. **67**: 1131-1143.
- Roth LE & Stacey G (1989) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* **49**: 13-23.
- Roux B, Rodde N, Jardinaud MF, *et al.* (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* **77**: 817-837.
- Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R & Udvardi MK (2020) Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* **32**: 15-41.
- Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R & Udvardi MK (2020) Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **32**: 15-41.
- Saifi F, Biro JB, Horvath B, *et al.* (2024) Two members of a Nodule-specific Cysteine-Rich (NCR) peptide gene cluster are required for differentiation of rhizobia in *Medicago truncatula* nodules. *Plant J* **119**: 1508-1525.
- Salonen A & de Vos WM (2014) Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annual review of food science and technology* **5**: 239-262.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Satge C, Moreau S, Sallet E, *et al.* (2016) Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. *Nat Plants* **2**: 16166.
- Sauviac L, Remy A, Huault E, *et al.* (2022) A dual legume-rhizobium transcriptome of symbiotic nodule senescence reveals coordinated plant and bacterial responses. *Plant Cell Environ* **45**: 3100-3121.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schippers JH, Schmidt R, Wagstaff C & Jing HC (2015) Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence. *Plant Physiol* **169**: 914-930.
- Schultze M, Staehelin C, Rohrig H, John M, Schmidt J, Kondorosi E, Schell J & Kondorosi A (1995) In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2706-2709.
- Segundo E, Martinez-Abarca F, Dillewijn P, Fernandez-Lopez M, Lagares A, Martinez-Drets G, Niehaus K, Puhler A & Toro N (1999) Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 169-176.
- Servin-Garciduenas LE, Rogel MA, Ormeno-Orrillo E, Zayas-Del Moral A, Sanchez F & Martinez-Romero E (2016) Complete Genome Sequence of Bradyrhizobium sp. Strain CCGE-LA001, Isolated from Field Nodules of the Enigmatic Wild Bean Phaseolus microcarpus. *Genome Announc* **4**.
- Sharma V, Bhattacharyya S, Kumar R, *et al.* (2020) Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between Bradyrhizobium and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants (Basel)* **9**.
- Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR & Tang WJ (2006) Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* **443**: 870-874.
- Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- 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**: 139-152.
- Smith DR, Owens PR, Leytem AB & Warnemuende EA (2007) Nutrient losses from manure and fertilizer applications as impacted by time to first runoff event. *Environmental Pollution* **147**: 131-137.
- Smith PM & Atkins CA (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol* **128**: 793-802.
- 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 Genet* **9**: e1003352.
- Soyano T, Hirakawa H, Sato S, Hayashi M & Kawaguchi M (2014) NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 14607-14612.
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G & Harris JM (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**: 961-970.
- Sutton MA, Oenema O, Erisman JW, Leip A, van Grinsven H & Winiwarter W (2011) Too much of a good thing. *Nature* **472**: 159-161.
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, *et al.* (2014) An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 312.
- Tatusov RL, Koonin EV & Lipman DJ (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**: 631-637.
- Tejada-Jimenez M, Gil-Diez P, Leon-Mediavilla J, Wen J, Mysore KS, Imperial J & Gonzalez-Guerrero M (2017) *Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (*MtMOT1.3*) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency. *New Phytol* **216**: 1223-1235.

- Terpolilli JJ, Masakapalli SK, Karunakaran R, Webb IUC, Green R, Watmough NJ, Kruger NJ, Ratcliffe RG, Poole PS & Zhulin IB (2016) Lipogenesis and Redox Balance in Nitrogen-Fixing Pea Bacteroids. *Journal of Bacteriology* **198**: 2864-2875.
- Torres Tejerizo G, Del Papa MF, de los Angeles Giusti M, Draghi W, Lozano M, Lagares A & Pistorio M (2010) Characterization of extrachromosomal replicons present in the extended host range *Rhizobium* sp. LPU83. *Plasmid* **64**: 177-185.
- Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Giusti MA, Draghi W, Lozano M, Lagares A & Pistorio M (2010) Characterization of extrachromosomal replicons present in the extended host range *Rhizobium* sp. LPU83. *Plasmid* **64**: 177-185.
- Torres Tejerizo G, Pistorio M, Althabegoiti MJ, Cervantes L, Wibberg D, Schluter A, Puhler A, Lagares A, Romero D & Brom S (2014) Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 565-578.
- Torres Tejerizo G, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, *et al.* (2016) *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**: 4451-4457.
- Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Soria-Diaz ME, *et al.* (2011) The nodulation of alfalfa by the acid tolerant *Rhizobium* sp. strain LPU83 does not require sulfated forms of lipochitooligosaccharide nodulation signals. *J Bacteriol* **193**: 30-39.
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T & Singh BK (2020) Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* **18**: 607-621.
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé J-C & Dénarié J (1991) Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Tung WL & Chow KC (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129.
- Udvardi M & Poole PS (2013) Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 781-805.
- UniProt C (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* **51**: D523-D531.
- Van de Velde W (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**: 711-720.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, *et al.* (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122-1126.
- Vasse J, de Billy F, Camut S & Truchet G (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**: 4295-4306.
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, *et al.* (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**: 2093-2105.
- Vincent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.
- Wang C, Saldanha M, Sheng X, Shelswell KJ, Walsh KT, Sobral BWS & Charles TC (2007) Roles of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen in symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago* sp. *Microbiology (Reading)* **153**: 388-398.
- Wang D, Yang S, Tang F & Zhu H (2012) Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* **14**: 334-342.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T & Long S (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**: 1126-1129.
- Wang Q, Yang S, Liu J, *et al.* (2017) Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201700715.
- Wegener C, Schröder S, Kapp D, *et al.* (2001) Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa-nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. *Symbiosis* **30**: 141-162.
- Wendlandt CE, Roberts M, Nguyen KT, Graham ML, Lopez Z, Helliwell EE, Friesen ML, Griffiths JS, Price P & Porter SS (2022) Negotiating mutualism: A locus for exploitation by rhizobia has a broad effect size distribution and context-dependent effects on legume hosts. *J Evol Biol* **35**: 844-854.

- Westermann AJ, Barquist L & Vogel J (2017) Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog* **13**: e1006033.
- Wibberg D, Tejerizo GT, Del Papa MF, Martini C, Pühler A, Lagares A, Schlüter A & Pistorio M (2014) Genome sequence of the acid-tolerant strain *Rhizobium* sp. LPU83. *J Biotechnol* **176C**: 40-41.
- Wu W, Zhuang Y, Chen D, *et al.* (2024) Methylated chalcones are required for rhizobial nod gene induction in the *Medicago truncatula* rhizosphere. *New Phytol* **242**: 2195-2206.
- Xu G, Fan X & Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 153-182.
- Yakhin OI, Lubyantsev AA, Yakhin IA & Brown PH (2016) Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front Plant Sci* **7**: 2049.
- Yang S, Wang Q, Fedorova E, *et al.* (2017) Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201700460.
- Yano K, Yoshida S, Müller J, *et al.* (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 20540-20545.
- Yokota K, Fukai E, Madsen LH, *et al.* (2009) Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**: 267-284.
- Young JP, Crossman LC, Johnston AW, *et al.* (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**: R34.
- Zadegan SB, Kim W, Abbas HMK, Kim S, Krishnan HB & Hewezi T (2024) Differential symbiotic compatibilities between rhizobium strains and cultivated and wild soybeans revealed by anatomical and transcriptome analyses. *Frontiers in plant science* **15**: 1435632.
- Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M & Aguilar OM (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. *Plant Cell* **22**: 4142-4157.
- Zhang J, Subramanian S, Stacey G & Yu O (2009) Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J* **57**: 171-183.
- Zhang R, Shen Y, He J, *et al.* (2023) Nodule-specific cysteine-rich peptide 343 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **193**: 1897-1912.
- Zhang X, Wu J & Kong Z (2024) Cellular basis of legume-rhizobium symbiosis. *Plant communications* 101045.

