



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

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

**“Análisis del traductoma en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*”**

**Lic. Mauricio Alberto Reynoso**

Director: Dra. María Eugenia Zanetti

Co-director: Dr. Flavio A. Blanco



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

UNLP – CONICET

Año 2013

*“Etre homme, c'est précisément être responsable. C'est sentir,  
en posant sa pierre, que l'on contribue à bâtir le monde.”*

*Antoine de Saint-Exupéry,  
extraído de « Terre des hommes » (Capítulo II), 1939.*

## *Agradecimientos*

A la Dra. María Eugenia Zanetti por la dirección del presente trabajo, y especialmente por su confianza, su fundamental aporte al trabajo y a mi formación.

Al Dr. Flavio A. Blanco por la co-dirección del presente trabajo, por su gran aporte a la tesis y a mi formación.

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

A la Facultad de Ciencias Exactas por permitir la realización de esta tesis en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET por el otorgamiento de becas que posibilitaron la realización de la tesis.

A las instituciones cuyos subsidios permitieron el desarrollo del presente trabajo: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica PICT 2007-00095; CONICET, NSF y CNRS por los convenios de cooperación que posibilitaron mi estadía en EE.UU. y Francia.

Al Dr. Martín Crespi, *Institut des Sciences du végétal CNRS France* por su ayuda en el presente trabajo y sus aportes en mi formación.

A la Dra. Julia Bailey-Serres, Universidad de California Riverside, EE.UU. por ofrecer la posibilidad de realizar pasantías de trabajo en su laboratorio y por brindar material para la presente tesis.

Al Dr. Andreas Niebel, *Laboratoire des interactions plantes microorganismes INRA CNRS France*, por la posibilidad de realizar una pasantía de trabajo en su laboratorio y por brindar material para esta tesis.

Al Dr. Reed Sorenson y la Dra. Piyada Juntawong por la ayuda brindada durante la pasantía realizada en la Universidad de California Riverside.

A la Dra. Pilar Bustos, *Institut des Sciences du végétal CNRS France* por ceder vectores para el presente trabajo.

Al Lic. Germán A. Islan, CINDEFI UNLP, Lic. Jorge L. Pórfido, INIBIOLP UNLP, Lic. María E. Zurita por su ayuda con equipamiento.

A los compañeros y personal de apoyo del IBBM en general.

A los miembros y ex miembros del laboratorio R4, Ana Claudia, Carolina, Joaquín, Marcos, Marina, Mélisse, Pia, Priscila y Virginia por acompañar, escuchar, aconsejar y ayudar cuanto se requiera.

A Eugenia y Flavio por su ética de trabajo y su calidad humana.

A Laura y Melisa por muchos años de buena convivencia.

A los amigos que me acompañaron a lo largo de esta tesis y a los que me acompañan siempre.

A Mélisse por estar conmigo siempre, aún a la distancia.

A mi familia, Andrés, Patricia, Mile, Matías, Eli y Laura por apoyarme y estar allí para dar una mano cada vez que se necesita.

A mis papás por su apoyo incondicional y por el ejemplo cotidiano del trabajo, el esfuerzo y la bondad.

A mi abuelo por su fuerza para seguir todos los días.

A mis abuelos José y Peti que me acompañaran cada día.

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

**Reynoso MA, Blanco FA, Bailey Serres J, Crespi M and Zanetti ME.** (2013). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 73 (2): 289-301.

**Reynoso MA, Blanco FA, Zanetti ME.** (2012). Insights into post-transcriptional regulation during legume-rhizobia symbiosis. *Plant Signaling & Behaviour*. doi.org/10.4161/psb.23102.

**Mazziotta L\*, Reynoso MA\*, Aguilar OM, Blanco FA, Zanetti ME.** (2012). Transcriptional and functional variation of NF-YC1 in genetically diverse accessions of *Phaseolus vulgaris* during the symbiotic association with *Rhizobium etli*. *Plant Biology*. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00683.x. \* ambos autores contribuyeron de igual manera

**Reynoso MA, Savy V, Lancia M, Hobecker K, Blanco FA and Zanetti ME.** *Medicago truncatula: a model organism to study the biology of agricultural important legume crops*. Legumes: Types, Nutritional Composition And Health Benefits. Nova Publishing, NY, USA. ISBN 978-1-62808-280-7.

## Índice general

<b><u>Resumen</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Introducción</u></b> .....	<b>2</b>
<b><u>Hipótesis y Objetivos</u></b> .....	<b>29</b>
<b><u>Resultados</u></b> . Capítulo I.....	<b>31</b>
Capítulo II.....	<b>42</b>
Capítulo III .....	<b>58</b>
Capítulo IV .....	<b>71</b>
<b><u>Discusión</u></b> .....	<b>81</b>
<b><u>Materiales y Métodos</u></b> .....	<b>97</b>
<b><u>Bibliografía</u></b> .....	<b>123</b>
<b><u>Anexos</u></b> .....	<b>139</b>

## Índice Temático

<b><u>Resumen</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Introducción</u></b> .....	<b>2</b>
1. Importancia de las leguminosas.....	2
2. <i>Medicago truncatula</i> como leguminosa modelo .....	4
3. Simbiosis fijadora de nitrógeno .....	5
3.1. Respuestas fisiológicas y morfológicas de las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica con rizobios .....	5
3.2. Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por rizobios en las raíces de leguminosas .....	7
4. Regulación de la expresión génica en plantas .....	13
4.1. Mecanismos de regulación de la expresión génica .....	13
4.2. Regulación de la traducción de mRNAs.....	16
4.3. Regulación por sRNAs en plantas .....	20
4.4. Funciones de los miRNAs en la nodulación.....	24
5. Herramientas para el estudio de la expresión génica en tipos celulares específicos.....	25
<b><u>Hipótesis y Objetivos</u></b> .....	<b>29</b>
<b><u>Resultados</u></b> .....	<b>31</b>
<i>Capítulo I.</i> Optimización de la purificación por afinidad de ribosomas involucrados en traducción (TRAP) en <i>Medicago truncatula</i> .....	31
<i>Capítulo II.</i> Análisis de la regulación traduccional de genes involucrados en la simbiosis mediante TRAP .....	42
<i>Capítulo III.</i> TRAP para la obtención de traductomas de tipos celulares específicos de la raíz de <i>M. truncatula</i> .....	58

Capítulo IV. Análisis de pequeños RNA asociados a la maquinaria traduccional en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno..... 71

**Discusión..... 81**

1. Reclutamiento selectivo de transcritos a complejos traduccionales en respuesta a la inoculación..... 81

2. Análisis de transcritos asociados a complejos traduccionales de tipos celulares específicos de la raíz en respuesta a la inoculación ..... 85

3. Análisis de sRNAs asociados a complejos traduccionales ..... 88

    3.1. Niveles de asociación de sRNAs a polisomas y su posible mecanismo de acción ..... 88

    3.2. Regulación de NF-YA1 durante la nodulación..... 89

4. La función de miR390 en la formación de raíces laterales y nódulos ..... 91

5. Extensión de la técnica de TRAP a la leguminosa modelo *M. truncatula*..... 93

    5.1. TRAP a partir de raíz completa y de tipos celulares específicos ..... 93

    5.2. Ventajas del uso de TRAP acoplado a técnicas de secuenciación masiva..... 94

6. Observaciones finales ..... 96

**Materiales y Métodos..... 97**

1. Material biológico ..... 97

    1.1. Material vegetal ..... 97

    1.2. Cepas bacterianas ..... 97

    1.3. Vectores de clonado..... 97

    1.4. *Primers*..... 98

2. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico ..... 98

    2.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico ..... 88

    2.2. Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción ..... 99

    2.3. Amplificaciones de fragmentos de DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ..... 99

    2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa ..... 100

    2.5. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa ..... 101

    2.6. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA..... 101

    2.7. Clonado de fragmentos de PCR en *pENTR/D-TOPO* ..... 101

    2.8. Recombinación sitio específica mediante el sistema *Gateway* (LR clonasa)..... 101

2.9. Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competentes .....	102
2.10. Transformación de células DH5 $\alpha$ competentes.....	102
3. Construcción de plásmidos.....	103
3.1. Construcción de plásmidos para expresar RPL18 de <i>M. truncatula</i> bajo el control de distintas secuencias promotoras .....	103
3.1.1. Obtención de p35S:FLAG-RPL18 mediante el clonado de RPL18 en el vector p35S:HF .....	103
3.1.2. Obtención de pCO2:FLAG-RPL18 y pSUC2:FLAG-RPL18 .....	103
3.1.3. Obtención de pEXP7:FLAG-RPL18.....	104
3.2. Construcciones para evaluar la expresión de los promotores pEXP7, pCO2 y pSUC2 en raíces de <i>M. truncatula</i> .....	105
3.3. Construcción para sobreexpresar miR390.....	105
4. Generación de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i> .....	106
4.1. Preparación de células de <i>A. rhizogenes</i> ARqua1 electrocompetentes .....	106
4.2. Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> ARqua1 mediante electroporación.....	106
4.3. Esterilización y germinación de semillas de <i>M. truncatula</i> .....	106
4.4. Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> utilizando <i>A. rhizogenes</i> ARqua1 .....	107
5. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas.....	108
5.1. Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con <i>S.meliloti</i> .....	108
5.2. Ensayos de nodulación en perlita/arena.....	108
5.3. Evaluación fenotípica de plantas compuestas.....	109
6. Técnicas para la obtención de polisomas.....	109
6.1. Purificación de polisomas mediante TRAP a partir de raíces de <i>M. truncatula</i> .....	109
6.2. Purificación de polisomas mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.....	111
7. Métodos para la extracción, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos.....	113
7.1. Extracción de DNA genómico.....	113



7.2. Extracciones de RNA .....	114
7.2.1. Extracciones de RNA a partir de tejido de raíz .....	114
7.2.2. Extracciones de RNA a partir de muestras de TRAP .....	115
7.2.3. Extracciones de RNA a partir de muestras de polisomas obtenidas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa .....	115
8. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcritos .....	116
8.1. Digestión de DNA genómico en muestras de RNA .....	116
8.2. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa.....	116
8.3. Ensayos de qPCR .....	116
8.4. Análisis y normalización de los datos de qPCR.....	117
9. Métodos para la cuantificación de los niveles de sRNAs .....	117
9.1. Síntesis de cDNA utilizando el sistema miScript .....	117
9.2. Ensayos de qPCR para sRNAs .....	117
9.3. Clonado y secuenciación de los productos de qPCR.....	118
10. Métodos utilizados para el análisis de proteínas.....	118
10.1. Preparación de muestras de proteínas.....	118
10.2. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	119
10.3. Tinción con plata de las proteínas separadas por SDS-PAGE.....	119
10.4. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa .....	120
11. Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizados para el análisis de secuencia .....	121
11.1. Herramientas bioinformáticas .....	121
11.2. Bases de datos de secuencias.....	122
12. Microscopía confocal .....	122
<b><u>Bibliografía</u></b> .....	<b>123</b>
<b><u>Anexos</u></b> .....	<b>139</b>
<i>Anexo I. Secuencias</i> .....	139
<i>Anexo II. Primers</i> .....	143

## Abreviaturas

- A: absorbancia
- ACT11: ACTINA11
- ARF: *auxin response factors*
- AGO: argonauta
- bHLH: factores de transcripción del tipo *basic Helix loop helix*
- CaMV 35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor
- Cap: 5' m<sup>7</sup>GpppN
- CBP: *cap binding protein*
- CCaMK: *calcium calmodulin dependent kinase*
- cDNA: ácido desoxirribonucleico copia
- CO2: proteína de unión a lípidos
- CRE: *cytokin response element*
- Ct: ciclo de detección umbral de qPCR
- DCL: endorribonucleasa **Dicer Like**
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DMI: gen *does not make infections*
- Dpi: días post-inoculación
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
- EGTA: ácido etilen glicol bis ( aminoetil-éter)-N, N', N', tetraacético
- eIF: *eukaryotic initiation factor*
- EMS: metanosulfonato de etilo
- ENOD: *Early Nodulin*
- ERN: *Ethylene Response Factor Required for Nodulation*
- EXP: expansina
- EV: *empty vector*
- FACS: *fluorescence-activated cell sorting*
- FLAG: péptido DYKDDDDK
- GAT: *cassette de gateway*
- GDP: guanosina di-fosfato
- GFP: *green fluorescent protein*
- GRAS: Giberellic acid-Insensitive (GAI), **R**epressor of GAI (RGA) and Scarecrow (SCR)
- GTP: guanosina tri-fosfato
- GUS: -glucuronidasa
- GW: dominio proteico con repeticiones ricas en glicina y triptofano
- HD-Zip: *homeodomain-leucine zipper*

## Abreviaturas

- HF: epitope dual His-FLAG
- His: epitope de histidinas
- HIS3L: histona3
- Hpi: horas post-inoculación
- HRP: *horseradish peroxidase*
- HSP70: *heat shock proteins 70*
- IPD3: *interacting protein of dmi3*
- LCM: *laser capture microdissection*
- LIN: *lumpy infection*
- LB: borde izquierdo del T-DNA
- LP: polisomas grandes (5 o más ribosomas por transcripto)
- LRR: *leucine rich repeat*
- LYK3: **LysM receptor like kinase III**
- Mbp: millones de pares de bases
- miRNA: micro RNA
- Mock: inoculación con agua
- MOPS: ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfónico ácido 4-(N-Morfolino)propanosulfónico
- mRNA: RNA mensajero
- NBS: *nucleotide binding site*
- NFP: *nod factor perception*
- NF-Y: *nuclear factor Y*
- NIN: *nodule inception*
- NP: fracción sin polisomas
- NSP: *nodule signalling pathway*
- nts: nucleótidos
- NUP: nucleoporina
- ocs: octopina sintasa
- ORF: *open reading frame*
- P: polisomas
- P-170: precipitado de 170.000 xg
- PABP: *polyA binding protein*
- Pb: pares de bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PEB: *buffer* de extracción de polisomas
- PEP: peptidasa
- phasiRNA: *phased registered small interfering RNA*
- PMSF: fenilmetil sulfonil fluoruro
- pre-mRNA: precursor de mRNA
- PTE: polyoxoetilen-10-tridecil eter

- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- RB: borde derecho del T-DNA
- RBP: *RNA binding protein*
- RDR6: RNA polimerasa dependiente de RNA
- RISC: complejo inductor de silenciamiento por *RNA-induced silencing complex*
- RIP: inmunopurificación de RNA por *RNA immunopurification*
- RIP1: *Rhizobium meliloti induced peroxidase*
- RNA: ácido ribonucleico
- RNP: complejo ribonucleoproteico
- RLK: *receptor like kinase*
- RP: proteína ribosomal
- RPL: proteína ribosomal de la subunidad mayor
- RPS: proteína ribosomal de la subunidad menor
- RR: reguladores de respuesta a citoquininas
- rRNA: ácido ribonucleico ribosomal
- RT: transcripción reversa
- S: Sverberg
- S-16: sobrenadante a 16.000 xg
- S-170: sobrenadante a 170.000 xg
- SDS: dodecil sulfato de sodio
- SGS3: *supressor of gene silencing 3*
- siRNA: *small interfering RNA*
- SP: polisomas pequeños (de 2 a 5 ribosomas por transcripto)
- SUC2: transportador de sacarosa 2
- sRNA: *small RNA*
- TAS: transcripto no codificante del que derivan tasiRNAs
- tasiARF: *trans acting small interfering ARF*
- tasiRNA: *trans acting small interfering RNA*
- TBE: tris *buffer* EDTA
- TBS: tris *buffer* salino
- T-DNA: DNA de transferencia de la planta
- TEMED: N`-N`-N`-N` tetrametiletilenediamina
- TF: factor de transcripción
- TILLING: *Target Induced Lesions in Genomes*
- TRAP *Translating Ribosome Affinity Purification*
- UB: *Unbound*
- uORF: marco abierto de lectura previo al ORF principal
- UTR: *untranslated region*
- UV: luz ultravioleta

### *Abreviaturas*

- WB: *buffer* de lavado
- xg: veces de gravedad
- 3UM: motivo del 3` UTR
- 5UM: motivo del 5` UTR

## Resumen

La capacidad de las leguminosas de establecer una asociación simbiótica con bacterias de suelo es de fundamental importancia para la incorporación de nitrógeno a los ecosistemas, particularmente en sistemas agronómicos. En el presente trabajo de tesis se estudió la dinámica de la asociación de transcriptos (mRNAs) y miRNAs a complejos traduccionales durante las etapas tempranas de la simbiosis. Para ello, inicialmente, se puso a punto de la técnica de purificación por afinidad de ribosomas y polisomas (TRAP) en *Medicago truncatula*. Se cuantificó la variación de los niveles de asociación a polisomas de quince mRNAs en respuesta a la inoculación con su simbionte *Sinorhizobium meliloti*. Se identificó un grupo de genes, cuyos mRNAs no varían significativamente a nivel de abundancia celular, pero que se regulan positivamente a nivel de su asociación a polisomas en respuesta al rizobio. Este grupo incluyó genes que codifican receptores de tipo quinasas requeridos para la infección bacteriana o la organogénesis del nódulo y factores de transcripción de la familia GRAS y NF-Y. Posteriormente, se evaluaron los niveles de asociación a polisomas de los mRNAs seleccionados en los tejidos específicos de la raíz involucrados en la formación de nódulos: epidermis, córtex y floema. Este análisis permitió identificar mRNAs que se asocian diferencialmente a polisomas en los distintos tipos celulares durante las etapas tempranas de la simbiosis. Por otro lado, se evaluó la presencia de pequeños RNAs (sRNAs) en los complejos traduccionales purificados mediante TRAP. Los sRNAs seleccionados, incluyendo miRNAs de 21 y 22 nts y tasiRNAs, se encontraron asociados a complejos traduccionales. En particular, los niveles de miR169 presentes en polisomas disminuyeron significativamente en respuesta a la inoculación. Esta disminución se vio acompañada de un incremento en la asociación a polisomas de su gen blanco, *NF-YA1*, y de los niveles de la proteína en las raíces inoculadas. Estos resultados indican que tanto los mRNAs como los miRNAs estarían sometidos a un reclutamiento diferencial a polisomas y expone la importancia de la traducción selectiva durante la simbiosis. La extensión de la técnica TRAP a *M. truncatula* abre la posibilidad de profundizar este nivel de regulación tanto a nivel de raíz completa como de tipos celulares específicos en asociaciones simbióticas como la nodulación y la micorrización arbuscular. El presente trabajo de tesis contribuye a sustentar la relevancia de los niveles de regulación post-transcripcional en los cambios de la expresión génica que ocurren durante el establecimiento de una asociación simbiótica de importancia ecológica y agronómica.

## ***Introducción***

### **1. Importancia de las leguminosas**

El crecimiento acelerado de la población mundial en los últimos 60 años plantea desafíos globales para la humanidad, entre los que se destaca la necesidad de incrementar la cantidad de alimentos disponibles. Las proyecciones de la ONU indican que la población mundial llegará a 9 mil millones de personas en 2050 (Raftery *et al.*, 2012). Se estima que se requerirá un aumento en la producción agrícola de entre 120 y 170 % para suplir las necesidades de esta población (Eckardt *et al.*, 2009), ya que las plantas son directa o indirectamente la base de la alimentación humana. El crecimiento y desarrollo de las plantas se ve limitado principalmente por la disponibilidad de agua y nutrientes minerales. Entre ellos, el nitrógeno es un elemento fundamental tanto en los ecosistemas naturales como en sistemas de importancia agronómica, ya que es componente esencial de ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares.

Si bien el 79 % de la atmósfera terrestre está formada por nitrógeno gaseoso, esta molécula no puede ser asimilada directamente por la gran mayoría de los organismos. Por este motivo, el nitrógeno es un factor limitante para el desarrollo vegetal. En los sistemas agrícolas, los fertilizantes químicos permiten complementar las deficiencias de nitrógeno de los suelos. El balance neto de la aplicación de la fertilización química es la obtención de mayor rendimiento de cultivos por área sembrada. El amonio representa el 90 % de los fertilizantes nitrogenados utilizados a nivel mundial. Sin embargo, gran parte del amonio aplicado no es incorporado a los cultivos y puede ser convertido a nitratos y nitritos por bacterias nitrificadoras (Canfield *et al.*, 2010). Estas moléculas percolan en la tierra contaminando el agua de ríos, lagos y acuíferos, lo que resulta en la eutrofización de las regiones costeras (Diaz and Rosenberg 2008). El proceso de desnitrificación puede producir óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), incrementando su concentración en la atmósfera. Este gas contribuye significativamente al efecto invernadero ya que absorbe radiación infrarroja y puede reaccionar con el ozono, disminuyendo su concentración en la atmósfera (Powlson *et al.*, 2008). Por otro lado, la síntesis química de amonio se realiza a partir H<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en condiciones de temperatura y presión muy elevadas mediante el proceso Haber-Bosch. La reacción requiere la síntesis de H<sub>2</sub> a partir de la combustión de hidrocarburos. Se estima que del 1

al 2 % del consumo mundial de combustibles fósiles es destinado a la producción de fertilizantes nitrogenados (Jenkinson 2001). En este contexto, la fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo por microorganismos, que permite la conversión de  $N_2$  a  $NH_3$ , constituye una alternativa natural y de bajo costo para disminuir la contaminación ambiental generada por el uso de fertilizantes químicos.

La mayoría de las plantas leguminosas son capaces de establecer una interacción simbiótica con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno, pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (conocidas como rizobios). Debido a su capacidad de establecer esta interacción simbiótica, las leguminosas han sido y son utilizadas en la rotación de cultivos, donde actúan como fertilizante natural para los subsecuentes cultivos. Además permiten reducir significativamente las poblaciones de patógenos vegetales, lo que se traduce en una menor aplicación de pesticidas (Lawlor *et al.*, 2001). Por otro lado, las leguminosas de granos ricos en proteínas, proveen aproximadamente el 33 % de las necesidades de nitrógeno de la dieta humana (Graham and Vance 2003). Las principales leguminosas para consumo humano son poroto (*Phaseolus vulgaris*), arveja (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), haba (*Vicia faba*), guandul (*Cajanus cajan*), caupí (*Vigna unguiculata*) y lenteja (*Lens culinaris*). Además, la soja (*Glicine max*) y el maní (*Arachis hypogea*) proveen más del 35 % del aceite vegetal consumido a nivel mundial. Leguminosas como alfalfa (*Medicago sativa*), algunas especies del género *Lotus* y especies del género *Trifolium* son utilizadas como forrajeras. Esto se debe a que son fuentes ricas en proteínas, energía y fibra. Por estas razones, las leguminosas resultan indispensables tanto para el mantenimiento de los ambientes ecológicos como para el desarrollo de sistemas de agricultura sustentable.



## **2. *M. truncatula* como leguminosa modelo**

La mayoría de las leguminosas de grano y forrajeras no son buenos sistemas experimentales para la investigación biológica. Esto se debe a que la mayor parte de las leguminosas cultivadas generan plantas y semillas de gran tamaño, lo que dificulta el cultivo en áreas pequeñas para la investigación experimental. Otras características que obstaculizan el estudio de algunas especies son su ciclo de vida largo o su limitada autocompatibilidad polínica, como por ejemplo en el caso de alfalfa (Brink and Cooper 1938). La tetraploidía de los genomas de algunas leguminosas como alfalfa y maní también dificultan los análisis genéticos. En este contexto, la comunidad internacional que investiga las leguminosas ha adoptado a *M. truncatula* y *L. japonicus* como leguminosas modelo (Barker *et al.*, 1990, Handberg and Stougaard 1992). *M. truncatula*, originaria del mediterráneo, es considerada como modelo de otras leguminosas de climas templados, como la arveja y la alfalfa. Sus semillas y plántulas son pequeñas (Cook 1999) y se adaptan a condiciones semiáridas. Puede reproducirse por autofertilización o mediante cruzamientos y su ciclo completo de vida es relativamente corto (3-4 meses). *M. truncatula* posee un genoma diploide pequeño (550 Mbp) que ha sido recientemente secuenciado (Young *et al.*, 2011). Asimismo, se han obtenido datos de expresión a gran escala de los principales órganos y en diversas condiciones ambientales mediante técnicas de hibridación de RNA a microarreglos de Affymetrix Medicago Gene Chip (Benedito *et al.*, 2008, He *et al.*, 2009).

Desde su selección como sistema modelo se han desarrollado herramientas que han permitido un avance significativo en el estudio de la interacción rizobio-leguminosa. Se destacan la posibilidad de generar plantas transgénicas mediante transformación estable con *Agrobacterium tumefaciens* (Trieu and Harrison 1996, Chabaud *et al.*, 2003, de Sousa Araújo *et al.*, 2004). A su vez, también es posible generar plantas compuestas que presenten raíces transgénicas y parte aérea *wild type* (no transgénico) mediante transformación con *A. rhizogenes* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Por otro lado, se han desarrollado protocolos de mutagénesis generalizada por tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS) o rayos  $\gamma$  (Benaben *et al.*, 1995, Sagan *et al.*, 1995). El *screening* de poblaciones de mutantes ha permitido avanzar en la identificación de genes involucrados en distintos procesos fisiológicos (Penmetsa and Cook 2000). Las estrategias de genética directa han generado importantes avances en el

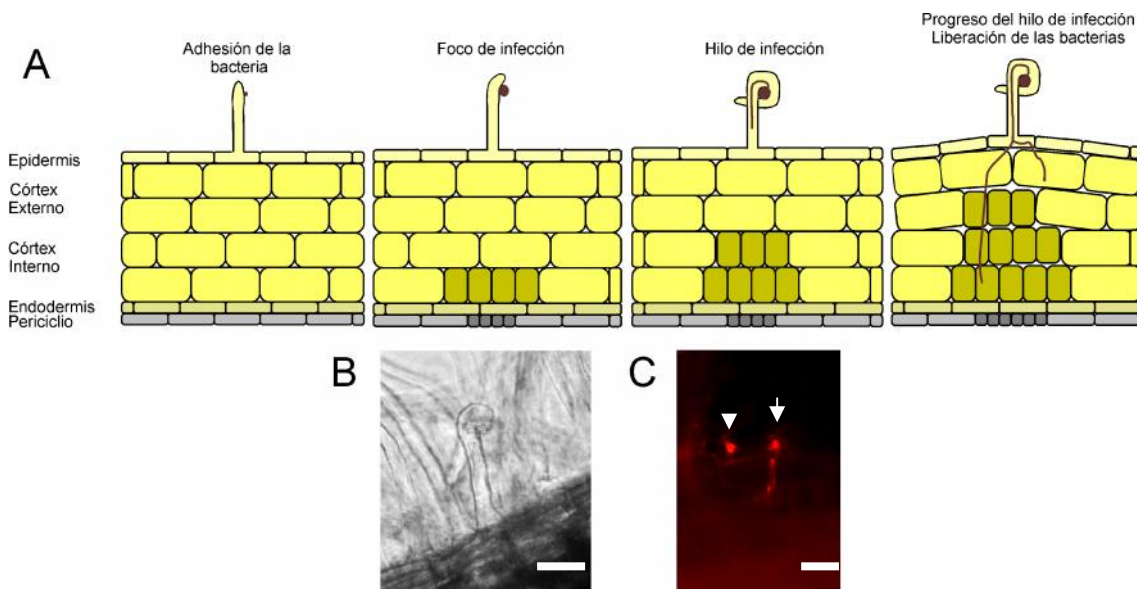
estudio de las vías de señalización de simbiosis, permitiendo la identificación de genes requeridos para completar los estadios iniciales de la simbiosis (Catoira *et al.*, 2000, Wais *et al.*, 2000). Posteriormente, el desarrollo de poblaciones mutantes por inserción con transposones *Tnt-1* permitieron la aplicación de estrategias de genética reversa al estudio de distintos procesos de desarrollo, respuesta a estímulos ambientales e interacciones con microorganismos (d'Erfurth *et al.*, 2003, Tadege *et al.*, 2008, Pislariu *et al.*, 2012). Por otro lado, se han generado plataformas de mutantes de un único nucleótido mediante la inducción de lesiones en el genoma con EMS y la posterior identificación de estas mutaciones utilizando la técnica conocida como TILLING (por *Target Induced Lesions in Genomes*; Le Signor *et al.*, 2009). El desarrollo de estas herramientas técnicas y genómicas han contribuido al establecimiento de *M. truncatula* como leguminosa modelo.

### **3. Simbiosis fijadora de nitrógeno**

#### **3.1. Respuestas fisiológicas y morfológicas de las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica con rizobios**

La interacción simbiótica entre plantas leguminosas y rizobios resulta en la formación de un nuevo órgano en las raíces de la planta, denominado nódulo. Esta asociación mutualista es beneficiosa para ambos organismos: la bacteria brinda una fuente de nitrógeno reducido que puede ser asimilada fácilmente por la planta, y recibe de esta última la fuente de carbono necesaria para el crecimiento bacteriano (Gresshoff 2003). El nódulo es un ambiente propicio para la conversión de nitrógeno atmosférico a amonio a través de una reacción altamente endergónica llevada a cabo por el complejo multienzimático de la nitrogenasa, presente en los rizobios. La formación de un nódulo funcional depende de la activación de dos programas morfogénicos en la planta: la formación del nódulo y la infección bacteriana (Oldroyd *et al.*, 2011). La organogénesis del nódulo comienza con la reactivación de las divisiones celulares en el córtex y el periciclo para formar el primordio nodular. Por otro lado, el proceso de infección bacteriana ocurre en la mayoría de las leguminosas mediante un sofisticado mecanismo intracelular (Figura 1). Las bacterias se adhieren a los pelos radicales en crecimiento

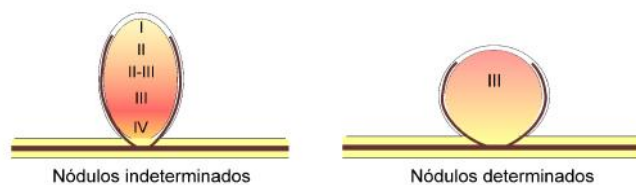
activo que, en respuesta, se deforman reorientando su crecimiento para formar un rulo. La bacteria queda atrapada y forma una microcolonia. Allí se produce la degradación de la pared celular, la invaginación de la membrana plasmática vegetal y se inicia la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección (Timmers *et al.*, 1999). A través del hilo de infección, la bacteria penetra el pelo radical y alcanza las células corticales, que previamente se han dediferenciado y dividido para formar el primordio del nódulo. Las bacterias son liberadas dentro de las células corticales en un proceso similar a la endocitosis y se rodean por una membrana, formando estructuras tipo organelas denominadas simbiosomas. Dentro de los simbiosomas se produce la diferenciación de los rizobios a bacteroides, responsables de la fijación activa de nitrógeno (Oldroyd and Downie 2008).



**Figura 1. Etapas tempranas de la infección por rizobios.** **A.** Se esquematiza el proceso de infección iniciado a partir de la adhesión del rizobio al pelo radical. En respuesta al factor Nod, una molécula lipoquitooligosacárido secretado por el rizobio, el pelo radical reorienta su eje de crecimiento para formar un rulo donde la bacteria queda atrapada y forma una microcolonia (o foco de infección). Al mismo tiempo comienzan a dividirse las células del córtex interno (marcadas en amarillo oscuro) y del periciclo (gris oscuro). La infección progresa con el desarrollo del hilo de infección, el cual se ramifica y alcanza el primordio nodular, donde se produce la liberación e invasión de las células del córtex. **B.** Deformación y enulado de un pelo radical de *M. truncatula* a los 5 dpi con *S. meliloti*, visualizado por microscopía óptica. **C.** Un foco de infección (punta de flecha) y un hilo de infección (flecha) formados en raíces de *M. truncatula* visualizados mediante microscopía de epifluorescencia a los 5 dpi con una cepa de *S. meliloti* que expresa la proteína roja fluorescente (RFP). Escala de la barra en B y C: 50 µm.

Existen dos tipos diferentes de nódulos: los nódulos indeterminados se forman en las leguminosas de clima templado, como arveja y alfalfa, mientras que los determinados se forman en las leguminosas de climas tropicales o subtropicales, como poroto y soja (Figura 2; Hirsch 1992). En los nódulos indeterminados, el primordio del

nódulo se desarrolla a partir del córtex interno. Las células del córtex externo también son activadas tal como lo evidencia la reorientación de microtúbulos. Estas células forman una estructura de preinfección que permite el avance de los hilos de infección originados en la epidermis (van Brussel *et al.*, 1992, Timmers *et al.*, 1999). Los nódulos indeterminados maduros se caracterizan por la presencia de un meristema apical persistente responsable del crecimiento del nódulo, dando lugar a un órgano de forma cilíndrica. A su vez, estos nódulos presentan zonas claramente diferenciadas: la zona I o meristemática, la zona II o de infección, donde las bacterias son liberadas al interior de las células vegetales; la zona intermedia II-III, donde se produce la diferenciación a bacteroides, la zona III o de fijación de nitrógeno y la zona IV o de senescencia, donde tanto las células vegetales como las bacterianas degeneran (Figura 2). Los nódulos indeterminados exportan el nitrógeno fijado en forma de asparagina y glutamina principalmente, siendo las formas nitrogenadas más abundantes en el floema (Crespi and Galvez 2000). Por otro lado, los nódulos determinados desarrollan un meristema a partir de las células del córtex externo y su actividad meristemática desaparece tempranamente, dando lugar a nódulos esféricos, que crecen por la expansión celular y muestran una diferenciación temporal en lugar de espacial (Rolfe and Gresshoff 1988). La zona de infección de un nódulo determinado es la región central. En los nódulos determinados, el nitrógeno es exportado en forma de ureidos.



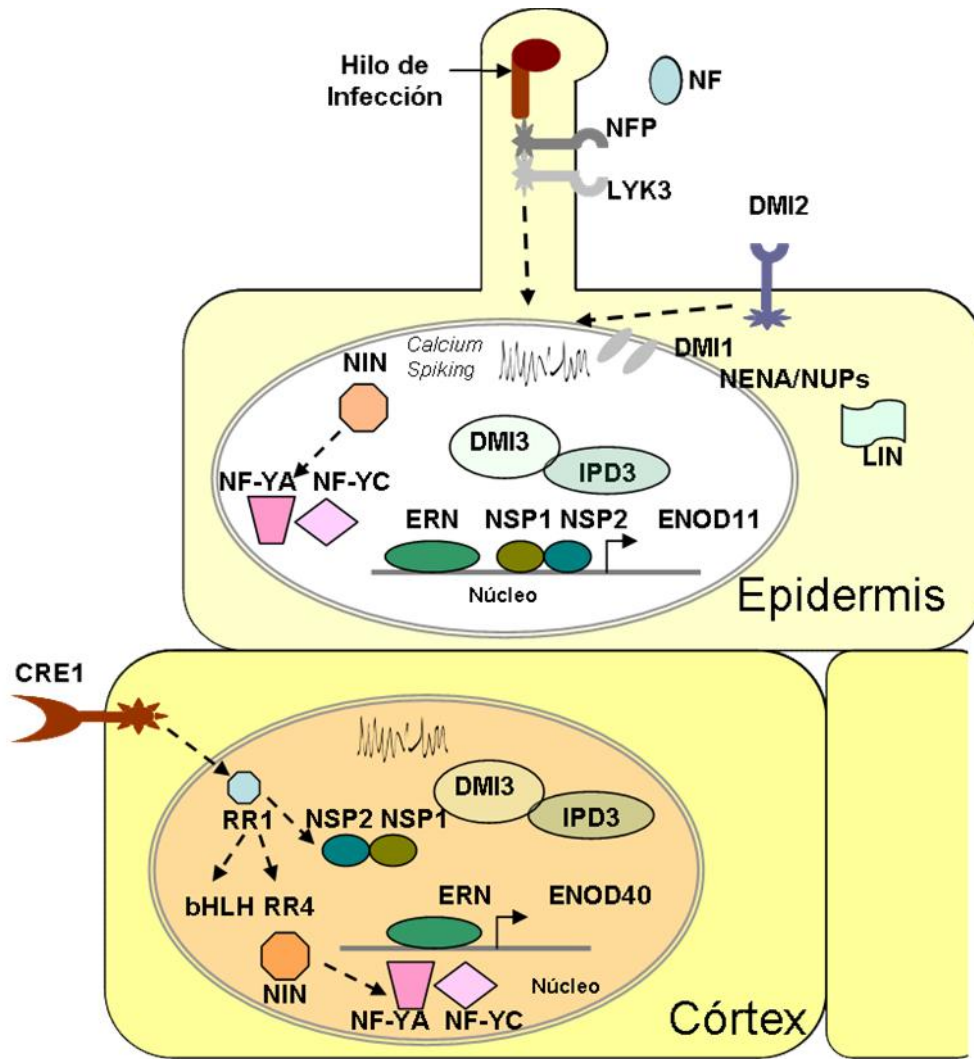
**Figura 2. Tipos de nódulos.** Para los nódulos indeterminados se indican las zonas meristemática (I), de infección (II), de diferenciación a bacteroides (II-III), de fijación de nitrógeno (III) y de senescencia del nódulo indeterminado (IV). Para los nódulos determinados se indica la zona de fijación de nitrógeno (III) que corresponde a la región central del nódulo. Los haces vasculares se indican en marrón.

### 3.2. Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por rizobios en las raíces de leguminosas

La formación del nódulo depende de la comunicación coordinada entre la bacteria y la raíz de la planta. El intercambio de señales se inicia en la rizósfera. En

condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, las raíces de las plantas exudan flavonoides e isoflavonoides. La percepción de estos compuestos activa la expresión de los genes bacterianos de la nodulación (genes *nod*), responsables de la síntesis y secreción de una molécula lipoquitoligosacárida denominada factor de nodulación o factor Nod (Debelle *et al.*, 1996, Denarie *et al.*, 1996). Esta molécula señal está compuesta por un esqueleto carbonado de cuatro o cinco residuos de N-acetil-glucosamina con modificaciones químicas en distintas posiciones. Estas sustituciones son características de cada especie de rizobio y determinan el rango de especies leguminosas que son capaces de colonizar (Debelle *et al.*, 1996, Denarie *et al.*, 1996). El reconocimiento específico de los factores Nod desencadena respuestas celulares relacionadas con la formación del nódulo, tales como la deformación de los pelos radicales, la formación de hilos de infección, y la división de células corticales (Hirsch 1992, Ardourel *et al.*, 1994).

Los avances más significativos en la comprensión de los eventos moleculares del proceso de infección han sido logrados mediante el *screening* de plantas mutantes que presentan defectos en diferentes etapas de la nodulación. Los componentes de la vía de señalización conocidos hasta el momento se ilustran en la Figura 3. A nivel molecular, el factor Nod es percibido por receptores de tipo quinasa, denominados NFP (*Nod factor perception*) y LYK3 (**L**ysM **r**eceptor **l**ike **k**inase **III**) en *M. truncatula* (Limpens *et al.*, 2003, Arrighi *et al.*, 2006). Mutantes en *NFP* y *LYK3* son incapaces de formar nódulos y no presentan respuestas tempranas tales como la deformación del pelo radical y la formación de hilos de infección (Arrighi *et al.*, 2006, Smit *et al.*, 2007). Estos receptores contienen dominios extracelulares LysM que son responsables de unir oligosacáridos con residuos de N-acetil-glucosamina (Mulder *et al.*, 2006) y dominios intracelulares de tipo quinasa, los que serían responsables de iniciar la transducción de señal mediante fosforilación de proteínas. En este sentido, se ha evidenciado que el receptor LYK3 presenta actividad de fosforilación *in vitro*, mientras que, NFP posee un dominio quinasa atípico que posiblemente carezca de actividad (Arrighi *et al.*, 2006, Klaus-Heisen *et al.*, 2011). También son requeridas para la infección bacteriana ligasas de ubiquitina tipo E3 como LIN (por **L**umpy **I**nfection; Kiss *et al.*, 2009). Este tipo de proteínas podría actuar regulando la cantidad y la localización de los receptores del factor Nod, así como otras proteínas de la vía de señalización de la nodulación (Oldroyd *et al.*, 2011).



**Figura 3. Vía de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre raíces de leguminosas y rizobios.** Los receptores LysM-RLK (NFP, LYK3) perciben los factores Nod (NF) producidos por los rizobios. Al mismo tiempo, un receptor tipo LRR-RLK (DMI2) se activa por un mecanismo aún desconocido. La señal percibida por estos receptores desencadena oscilaciones de calcio dentro y alrededor del núcleo (*calcium spiking*), las cuales requieren la acción del canal catiónico DMI1 y las proteínas del poro nuclear o nucleoporinas (NENA y NUPs). Dentro del núcleo, se cree que las oscilaciones de calcio son percibidas por la quinasa dependiente de calcio y calmodulina CcAMK o DMI3, la cual interactúa físicamente con IPD3. En la epidermis, la E3 ubiquitina ligasa LIN es requerida para la infección bacteriana. Los factores de transcripción NSP1 y NSP2, en conjunto con ERN, promueven la activación transcripcional de la nodulina ENOD11. A su vez, el factor de transcripción NIN es requerido tanto en la epidermis como en el córtex y los miembros de la familia NF-Y están involucrados directa o indirectamente en la activación de genes del ciclo celular que promueven las divisiones celulares en el córtex. ENOD40 es un RNA altamente estructurado requerido para la activación de las divisiones celulares en el córtex. En estas células se activa la cascada de señalización en respuesta a citoquininas mediada por el receptor CRE1. Esta recepción activa los factores de respuesta RR1 y a su vez sus genes blanco RR4, NSP2 y un factor de transcripción bHLH.

La cascada de señalización activada por el factor Nod involucra también al receptor DMI2 (por *does not make infections 2* o SYMRK en *L. japonicus*; Endre *et al.*, 2002). Se trata de un receptor de tipo quinasa con un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR; Figura 3). Los mutantes *dmi2* presentan

deformaciones de los pelos en respuesta al rizobio, pero son incapaces de formar hilos de infección impidiendo el progreso de la simbiosis. Otro gen requerido para la infección es *DMII*, el cuál codifica para un canal catiónico localizado en la membrana nuclear (Ane *et al.*, 2004). Este canal, junto con las proteínas del poro nuclear o nucleoporinas (NUPs y NENA en *L. japonicus*) es requerido para la generación de oscilaciones de calcio asociadas al núcleo que se producen en respuesta al factor Nod (Ehrhardt *et al.*, 1996, Kanamori *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2007, Groth *et al.*, 2010). Esta respuesta es conocida como *calcium spiking* (Figura 3). Se ha propuesto que *DMII* participaría en la despolarización de la membrana, provocando la apertura de canales de calcio operados por voltaje que regulan el flujo de calcio asociado al núcleo (Peiter *et al.*, 2007).

Las oscilaciones de calcio serían decodificadas en el núcleo por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK) denominada *DMI3* (Figura 3). Los mutantes *dmi3* presentan oscilaciones de calcio en respuesta al factor Nod, pero no forman hilos de infección (Lévy *et al.*, 2004, Mitra *et al.*, 2004). Una mutación de ganancia de función que produce una forma constitutivamente activa de esta proteína inicia una serie de respuestas moleculares que llevan a la nodulación espontánea, es decir, la formación de nódulos en ausencia del rizobio (Tirichine *et al.*, 2006, Hayashi *et al.*, 2010). A su vez, *DMI3* se asocia y fosforila a la proteína *IPD3* (por *Interacting protein of DMI3*), que es esencial para la nodulación (Messinese *et al.*, 2007, Horváth *et al.*, 2011). Las oscilaciones de calcio resultan en la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes tempranos de nodulación (*ENOD*) o nodulinas. El primer factor de transcripción caracterizado genéticamente fue *NIN* (por *Nodule Inception*; Figura 3). El análisis fenotípico de las mutantes *nin* reveló que la función del gen es requerida para la formación de hilos de infección y el inicio de las divisiones celulares en el córtex que dan lugar a la formación del primordio nodular (Schauser *et al.*, 1999). Posteriormente, se identificaron dos factores de transcripción denominados *NSP1* (*Nodulation Signalling Pathway 1*) y *NSP2* (Figura 3). Estos factores de transcripción pertenecen a la familia GRAS, cuyo nombre deriva de los tres miembros identificados originalmente [*Giberellic acid-Insensitive* (*GAI*), *Repressor of GAI* (*RGA*) and *Scarecrow* (*SCR*)]. *NSP1* y *NSP2* son requeridos para la formación del foco de infección y el desarrollo del primordio del nódulo (Kalo *et al.*, 2005, Smit *et al.*, 2005). Estos factores forman un heterodímero que se asocia y activa a los promotores de

los genes de la nodulina *ENOD11* y los factores de transcripción *NIN* y *ERN1* (por *Ethylene Response Factor Required for Nodulation 1*; Hirsch *et al.*, 2009). Plantas mutantes en *ERN1*, denominadas *bit-1* (*branched infection thread*), fallan en iniciar la formación de hilos de infección luego de la inoculación con rizobios (Middleton *et al.*, 2007). Además de los mencionados, existen otros factores de transcripción involucrados en la nodulación, tales como las subunidades A y C del complejo heterotrimérico NF-Y (por *Nuclear Factor Y*). Estos genes fueron caracterizados mediante genética reversa y han demostrado ser esenciales tanto para la formación y la progresión de hilos de infección, como también para etapas posteriores del desarrollo del nódulo (Combiér *et al.*, 2006, Zanetti *et al.*, 2010). A su vez, existen evidencias en *L. japonicus* de que *NIN* se une a las regiones promotoras de los genes que codifican los factores de transcripción del tipo NF-YA y NF-YB (Soyano *et al.*, 2013).

La activación de algunos de los factores de transcripción mencionados controla la expresión nodulinas. La nodulina *ENOD11*, que codifica una proteína con repeticiones ricas en prolina, se induce en respuesta al factor Nod (Journet *et al.*, 2001, Boisson-Dernier *et al.*, 2005) por unión del factor de transcripción *ERN1* a su promotor en forma independiente de *NSP1/NSP2* y activa su expresión en las células epidérmicas (Andriankaja *et al.*, 2007, Cerri *et al.*, 2012; Figura 3). Se ha descrito a *ENOD12* como otra nodulina inducida por la infección que codifica también una proteína con repeticiones ricas en prolina (Journet *et al.*, 1994). *ENOD12*, al igual que *ENOD11*, se asociaría a la pared celular para permitir las modificaciones de su estructura durante la infección y la organogénesis (Crespi and Galvez 2000). Por otro lado, la nodulina *ENOD40* ha sido involucrada en la organogénesis del nódulo (Crespi *et al.*, 1994). Los transcritos de *ENOD40* se acumulan en células corticales y del periciclo en división (Mathesius *et al.*, 2000). Las plantas transgénicas con niveles aumentados o disminuidos de *ENOD40* muestran nodulación aumentada o disminuida, respectivamente (Charon *et al.*, 1999, Wan *et al.*, 2007).

La organogénesis del nódulo es dirigida por la acción de fitohormonas, principalmente citoquininas y auxinas. El silenciamiento del receptor de citoquininas *CRE1* no impide la formación de hilos de infección, pero sí bloquea su progresión y el desarrollo de los nódulos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Figura 3). Además, una mutación de ganancia de función del gen ortólogo de *CRE1* en *L. japonicus*, *LHK1*, resulta en la formación de nódulos espontáneos (Tirichine *et al.*, 2007). Esto indica que



la señalización de citoquininas es necesaria y suficiente para disparar la organogénesis del nódulo. CRE1 activa un grupo de proteínas reguladoras de la respuesta a citoquininas denominadas RR (por *Response Regulators*), entre las cuales se encuentra RR1, un gen cuyo nivel de mRNA aumenta en nódulos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Figura 3). Más recientemente se identificaron NSP2, RR4 y un factor de transcripción de la familia bHLH (por *basic Helix-Loop-Helix*) como blancos de acción de RR1 (Ariel *et al.*, 2012; Figura 3). Otro de los efectos de la vía de señalización mediada por CRE1 es el cambio del transporte polar de auxinas, el cual es suprimido por la infección con rizobio y el tratamiento con factor Nod (Plet *et al.*, 2011). El rol de las auxinas fue inicialmente investigado mediante la aplicación de inhibidores del transporte de auxinas durante la formación del nódulo. Este tratamiento era suficiente para inducir la organogénesis del nódulo y la expresión de ENODs en alfalfa (Mathesius *et al.*, 1998). La inhibición localizada del transporte de auxinas modifica la relación entre citoquininas y auxinas en las células del córtex interno y el periciclo, permitiendo la iniciación de la organogénesis del nódulo (Wasson *et al.*, 2006). Estas células dan lugar a los primordios de nódulos indeterminados, donde las auxinas serían necesarias para la activación del ciclo celular en los estadios iniciales del desarrollo (van Noorden *et al.*, 2007, Grunewald *et al.*, 2009). Durante la diferenciación del primordio, la acción de las auxinas se ve restringida a las zonas de la vasculatura y meristemática, donde la hormona tendría un rol en el mantenimiento del meristema (Kondorosi *et al.*, 2005).

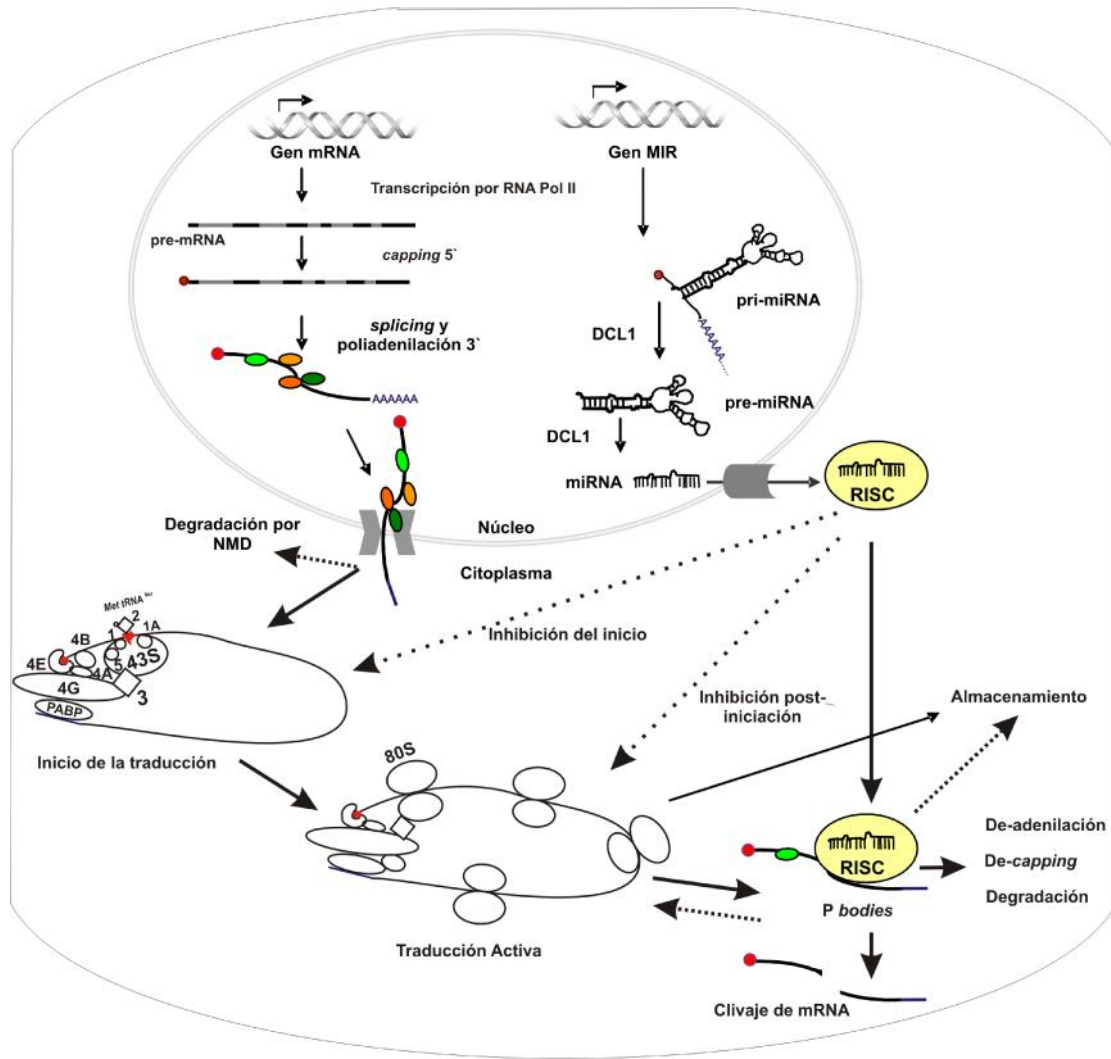
Tanto los análisis genéticos como los estudios de expresión de transcritos a escala genómica han contribuido a identificar algunos de los genes involucrados en el reconocimiento del factor Nod y los eventos de señalización posteriores en las leguminosas *M. truncatula* y *L. japonicus* (Lohar *et al.*, 2006, Benedito *et al.*, 2008, Hogslund *et al.*, 2009, Madsen *et al.*, 2010). Sin embargo, el transcriptoma representa los niveles estacionarios de un alto número de mRNAs, los cuales no necesariamente se correlacionan con los niveles de las proteínas que ellos codifican dentro de la célula (Hellmann and Estelle 2002, Kawaguchi *et al.*, 2004). Se ha señalado que los diferentes niveles de regulación post-transcripcional de la expresión génica contribuyen significativamente a esta falta de correlación entre los niveles de transcripto y proteína dentro de una célula vegetal. Por otro lado, los estudios de transcriptomas se han llevado a cabo utilizando organismos completos o diferentes órganos de la planta, y no han permitido hasta el momento distinguir la contribución de cada uno de los tipos

celulares contenidos dentro de los tejidos de las raíces de leguminosas involucrados en la simbiosis fijadora de nitrógeno.

#### **4. Regulación de la expresión génica en plantas**

##### **4.1. Niveles de regulación de la expresión génica**

La expresión génica es un proceso dinámico y altamente regulado a múltiples niveles por medio de diversos mecanismos (Figura 4). A nivel de la cromatina, los distintos grados de compactación y posicionamiento de los nucleosomas, así como los distintos patrones de acetilación de histonas, modifican la accesibilidad de los factores de transcripción al DNA (Lauria and Rossi 2011). Por otra parte, el nivel de metilación de citosinas en los dinucleótidos CG de las regiones codificantes también influye sobre las modificaciones de histonas en esa región (Deal and Henikoff 2011). Estas modificaciones son consideradas epigenéticas porque no están codificadas en el genoma, pero son parcialmente heredables. La transcripción se ve regulada también a nivel de la presencia de secuencias que actúan en *cis*, de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa II DNA dependiente (RNA Pol II) que sintetiza un transcripto primario, el pre-mRNA (Figura 4). Luego de la síntesis de los primeros 10-20 nucleótidos (nts), el pre-mRNA es modificado por la adición de un *cap* 5' m<sup>7</sup>GpppN que estabiliza el mRNA y que posee una función importante durante la traducción (Bailey-Serres *et al.*, 2009) (Figura 4). Posteriormente, ocurre el clivaje 3' del transcripto y la adición de una cola de poliA de 15-200 nts. Esta adición protege al transcripto de la degradación y facilita su traducción. La mayoría de los transcriptos de los organismos eucariotas contiene al menos un intrón en la región 5'UTR (por *Untranslated Region*) y/o en la región codificante (Figura 4). Los intrones son reconocidos por un complejo denominada *spliceosoma*, que los elimina en un proceso que ocurre en forma cotranscripcional en la mayoría de los casos.



**Figura 4. Esquematación de la regulación post-transcripcional en plantas.** Los mRNAs de plantas se transcriben en el núcleo por la RNA polimerasa II DNA dependiente (RNA Pol II). El producto de la transcripción (pre-mRNA) es procesado mediante la adición de un *cap* (m7GpppN) al extremo 5' (rojo), la remoción de intrones a través del *splicing*, el clivaje del 3' y la poliadenilación (azul). Durante su procesamiento, el mRNA se asocia a proteínas de unión a RNA (RBP, esquematizadas en colores verde y naranja) antes de ser exportado al citoplasma. En el citoplasma, los transcritos se asocian con el complejo de pre-iniciación 43S, que está compuesto de la subunidad ribosomal 40S, los factores de iniciación (eIF, 4E, 4G, 4A, 4B, 3, 1, 1A, 2 y 5), el Met-tRNA<sup>Met</sup>, y la proteína de unión a poliA (PABP). Los mRNAs siguen la vía de degradación por NMD (*non-sense mediated decay*) si en la primera ronda de traducción se detecta la presencia de codones de terminación prematuros. Los mRNAs que pasan este control pueden entrar en traducción activa en los polisomas (complejos de transcritos unidos a 2 o más ribosomas). Alternativamente, los transcritos pueden ser transportados a *P bodies* para su deadenilación, *decapping* y degradación o pueden ser almacenados en complejos RNPs. Por otro lado, los genes MIR también se transcriben presumiblemente por RNA Pol II para dar los miRNAs primarios (pri-miRNA) y se procesan por adición del 5' *cap*, y una cola de poliA. Estos RNAs forman estructuras complementarias imperfectas que son procesadas por DCL1 para dar precursores de miRNA (pre-miRNA), con estructuras de tallo y burbuja (*stem-loop*). DCL1 procesa el pre-miRNA para dar dúplex de miRNA/miRNA complementario (miRNA\*). Los miRNAs son exportados al citoplasma, donde se asocian a proteínas de la familia Argonauta para formar complejos RISC. Este complejo actúa a nivel del clivaje de los mRNAs blanco, o bien por inhibición de su traducción en las etapas de iniciación o post-iniciación.

En cada etapa de procesamiento el mRNA se asocia con proteínas de unión a RNA (RBP por *RNA Binding Protein*) incluyendo la proteína de unión al *cap* 5' (CBP)

y de unión al poliA (PABPs, por *polyA Binding Proteins*), así como otras RBPs dependiendo de la secuencia del transcripto (Lorkovic 2009; Figura 4). Estos mRNAs asociados a proteínas son transportados al citoplasma a través del poro nuclear, donde deben pasar una primera ronda de traducción. Aquellos mRNAs que presentan un codón de terminación prematuro son degradados a través del mecanismo de control *non sense mediated decay*, presente en plantas al igual que en otros eucariotas (Kerenyi *et al.*, 2008; Figura 4). Una vez en el citoplasma, aquellos mRNAs que pasan el control de calidad pueden ser mantenidos en complejos traduccionalmente inactivos o ser traducidos a proteína. Los transcriptos son traducidos en complejos ribonucleoproteicos (RNP) denominados polisomas que se forman por la asociación secuencial y sucesiva de ribosomas al mRNA. Además, las proteínas asociadas al 5' *cap* y al 3' poliA interactúan para circularizar el mRNA, lo que hace más eficiente el reciclado o reasociación de los ribosomas y, consecuentemente, la reiniciación de la traducción (Kawaguchi and Bailey-Serres 2002; Figura 4). Luego de la traducción, la proteína sintetizada puede ser procesada mediante modificaciones post-traduccionales, transportada, ensamblada dentro de complejos multiproteicos o degradada.

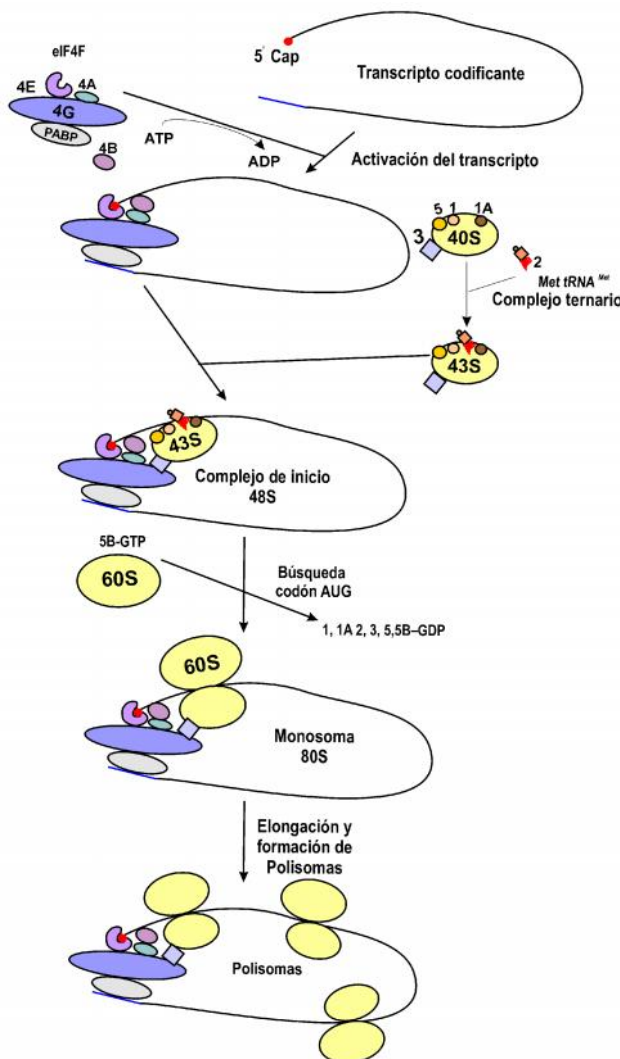
Las células poseen distintos complejos RNPs además de los ribosomas y polisomas (Figura 4). Los cuerpos de procesamiento (*P bodies*) están definidos por la presencia de proteínas involucradas en el *decapping*, deadenilación y degradación de los mRNAs. Son los sitios donde se degradan los transcriptos y se han asociado con el clivaje dirigido por los microRNAs (miRNAs; Balagopal and Parker 2009). Los gránulos de almacenamiento son RNPs que se acumulan de manera microscópicamente visible en respuesta al estrés celular donde secuestran los mRNAs impidiendo la traducción (Buchan and Parker 2009). Los *P bodies* y gránulos de almacenamiento contribuyen a la dinámica traduccional y la estabilidad de los mRNAs (Weber *et al.*, 2008). Por otro lado, múltiples RNA pequeños (sRNA), producidos mediante diversos mecanismos, regulan el silenciamiento transcripcional y post-transcripcional de genes. Los sRNAs ejercen su acción a través de la metilación de citosinas, la degradación de mRNAs y/o la represión traduccional (Voinnet 2009, Law and Jacobsen 2010, Chen 2012). Todos estos niveles contribuyen a regular la expresión génica dentro de la célula.

## 4.2. Regulación de la traducción de mRNAs

La traducción de mRNAs requiere la participación de complejos ribonucleoproteicos localizados en el citoplasma, los ribosomas. Los ribosomas de plantas muestran una arquitectura similar a la de otros eucariontes (Armache *et al.*, 2010, Ben-Shem *et al.*, 2011). Están compuestos de una subunidad mayor con un coeficiente de sedimentación de 60 Svedberg (S) y una menor de 40S. La subunidad mayor contiene los RNA ribosomales (rRNA) 25S-28S, 5,8S y 5S y hasta 47 proteínas ribosomales (RP por *Ribosomal protein*). La subunidad menor contiene el rRNA 18S y hasta 33 RPs diferentes (Chang *et al.*, 2005, Wilson and Doudna Cate 2012). A su vez, la caracterización del genoma de la planta dicotiledónea modelo *Arabidopsis thaliana* mostró que existen en promedio 3 genes que codifican cada RP, contribuyendo así a la heterogenicidad de los ribosomas (Barakat *et al.*, 2001). Teóricamente, existen  $10^{34}$  posibles combinaciones diferentes de ribosomas en *Arabidopsis*, sin incluir las posibles modificaciones post-traduccionales para cada RP (Hummel *et al.*, 2012).

Para la mayoría de los mRNAs, el proceso de traducción comienza a través de un mecanismo de escaneo de la región 5' UTR mediante la búsqueda del codón de inicio (Figura 5; revisado por (Sonenberg and Hinnebusch 2009). El factor de iniciación eIF4F (por *eucaryotic Initiation Factor*) se asocia al mRNA a través de su *cap*. El eIF4B desestabiliza la estructura secundaria de la región próxima al *cap* preparando al mRNA para la unión del ribosoma. El eIF4F está formado por la proteína de unión al *cap* eIF4E, la helicasa de RNA eIF4A, y la proteína eIF4G que se asocia a eIF4E, eIF4A y a la proteína PABP (Figura 5). Asimismo, el complejo ternario de GTP, eIF2 y Met-tRNA<sup>Met</sup>, complementario a AUG, se asocia a la subunidad 40S, que contiene a eIF3, eIF1y eIF1A, para formar el complejo de pre-iniciación 43S (Figura 5). A su vez, eIF4G se asocia con eIF3, lo que permite la unión del 43S al mRNA. El complejo posicionado escanea el 5' UTR en dirección 5' a 3' hasta posicionarse alrededor del codón de inicio. Este proceso de escaneo consiste en la desestabilización de la estructura secundaria y el avance del complejo. eIF1 y eIF1A son requeridos para este avance. Además, eIF1 y eIF1A participan del reconocimiento del codón de inicio y los ribonucleótidos cercanos, que proveen el contexto óptimo para el inicio de la traducción (Figura 5). Las purinas en las posiciones -3 y +4 (tomando la A del AUG como +1) afectan la selección del codón de inicio mediante la estabilización de cambios

conformacionales que ocurren en la interacción codón-anticodón mediante su interacción con eIF2. Una vez seleccionado el codón de inicio, eIF5 se une a eIF2 y promueve la hidrólisis de GTP a GDP en el complejo ternario y la posterior separación de eIF2. eIF5B media la unión de la subunidad 60S y la disociación de eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF2-GDP para dar lugar a la formación del complejo de iniciación 80S (Figura 5). Este complejo, junto con la acción de factores de elongación, es encargado de la etapa de elongación durante la traducción. La carga de sucesivos ribosomas al mRNA resulta en la formación polisomas (mRNA unidos a dos o más ribosomas; Figura 5).



**Figura 5. Esquema del inicio de la traducción.** El complejo de iniciación eIF4F está formado por la proteína de unión al cap eIF4E (4E), la helicasa de RNA eIF4A (4A), y la proteína eIF4G (4G) que funciona como andamio para la asociación de eIF4E, eIF4A y PABP. Este complejo se asocia al cap del mRNA en un proceso que es facilitado por eIF4B (4B). El complejo ternario formado por GTP, eIF2 (2) y el Met-tRNA<sup>Met</sup>, se asocia a la subunidad 40S, que contiene a eIF3 (3), eIF5 (5), eIF1 (1) y eIF1A (1A), para formar el complejo de pre-iniciación 43S. A su vez, eIF4G se asocia con eIF3, lo que permite la unión al mRNA para formar el complejo 48S. El complejo posicionado escanea el mRNA hasta localizar el codón de inicio. Una vez seleccionado el codón de inicio, eIF5 se une a eIF2 (2) y promueve la hidrólisis de GTP a GDP en el complejo ternario y da lugar a la separación de eIF2. eIF5B (5B) media la unión de la subunidad 60S y la disociación de eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF2-GDP, formando el complejo de iniciación 80S. Este complejo, junto con la acción de factores de elongación, es encargado de la elongación de la traducción. Por medio de la carga de sucesivos ribosomas al mRNA se forman complejos denominados polirribosomas o polisomas.

Si bien existen algunos ejemplos de inhibición selectiva de los pasos de elongación y terminación de la traducción en plantas (Onouchi *et al.*, 2008), en la mayoría de los casos la regulación traduccional ocurre en la etapa de iniciación (Kawaguchi and Bailey-Serres 2002, Bailey-Serres *et al.*, 2009). Una disminución en la

tasa de iniciación o re-iniciación de la traducción resulta en una reducción de la cantidad de ribosomas asociados a un mRNA. Esta regulación se visualiza como una disminución de los polisomas de gran tamaño y un incremento en los polisomas pequeños o de las fracciones no polisómicas en los perfiles de polisomas. Estudios previos han demostrado que la exposición de las plantas a ciertas condiciones ambientales, como deshidratación e hipoxia, causan una inhibición global en la iniciación de la traducción que se visualiza como una disminución del porcentaje de mRNAs asociados a los polisomas (Kawaguchi *et al.*, 2004, Branco-Price *et al.*, 2005). También existen ejemplos de regulación de la traducción a nivel de mRNAs individuales durante distintos estadios de desarrollo de las plantas o en respuesta a estímulos ambientales, tales como las transiciones luz-oscuridad, deshidratación, hipoxia, estrés salino y estrés por temperatura (Bailey-Serres 1999, Manjunath *et al.*, 1999, Kawaguchi *et al.*, 2004, Branco-Price *et al.*, 2005). Cabe destacar que tanto en condiciones de deshidratación como de baja disponibilidad de oxígeno, sólo el 50 % de los transcriptos que aumentan sus niveles estacionarios incrementan también su asociación a polisomas. Estos datos sustentan la idea de que un aumento en la abundancia de un transcripto no siempre se ve acompañado por un incremento en la síntesis de la proteína.

En *Arabidopsis*, el porcentaje de asociación a polisomas de transcriptos individuales puede variar de 95 % a 5 % en condiciones óptimas de crecimiento (Branco-Price *et al.*, 2005). Esto indica que puede existir una gran variación en el estado traduccional de los diferentes transcriptos. Estudios a escala genómica sobre la asociación de mRNAs individuales a polisomas pusieron en evidencia la selectividad del proceso traduccional, incluso en situaciones óptimas, enfatizando la importancia de la regulación de la traducción en la expresión génica (Kawaguchi *et al.*, 2004, Zanetti *et al.*, 2005, Branco-Price *et al.*, 2008). A partir de este tipo de estudios es posible identificar características particulares de los transcriptos que pueden influenciar la traducción. Por ejemplo, los mRNAs que se traducen a baja tasa en *Arabidopsis* contienen 5' UTRs más largos y con mayor contenido GC que el promedio (Kawaguchi and Bailey-Serres 2005). Otra característica distintiva de los mRNAs con una tasa de traducción menor a la media es la presencia de uno o varios marcos abiertos de lectura previos al principal (uORF; por *upstream open reading frame*). Por su parte, aquellos transcriptos cuyas regiones 3'UTR son de menor tamaño (40-100 nts) que el promedio

(240 nts) también presentan tasas de traducción menores (Kawaguchi and Bailey-Serres 2005).

En sistemas animales, la regulación del inicio de la traducción por interacción de RBPs con secuencias consenso ubicadas en el 5' UTR es poco frecuente. De los pocos casos encontrados surge la hipótesis de que la inhibición de la traducción puede ocurrir cuando las secuencias consenso de unión a RBP se encuentran en la región próxima al *cap*, de manera que la unión de una RBP inhibe la carga del complejo de pre-iniciación 43S (Muckenthaler *et al.*, 1998). Por otra parte se han identificado motivos consenso de unión a RBPs en la región 3' UTR. Los datos obtenidos hasta el momento apoyan un modelo en donde una RBP se une a la secuencia consenso del mRNA e interacciona directa o indirectamente con eIF4E, compitiendo con eIF4G e interfiriendo con el ensamblado del complejo eIF4F (Sonenberg and Hinnebusch 2009). En plantas, existen ejemplos en los cuales la presencia de secuencias consenso en las regiones 5' UTR, 3' UTR y del marco abierto de lectura (ORF) pueden regular el inicio de la traducción (Bailey-Serres 1999, Williams *et al.*, 2003). Las primeras evidencias se obtuvieron a partir de estudios de electroporación de mRNAs en protoplastos. El mRNA de *Adh1* (por *alcohol deshydrogenase I*) de maíz requiere de sus secuencias 5' y 3' UTR para la traducción eficiente bajo condiciones de hipoxia (Bailey-Serres and Dawe 1996). Otros ejemplos en sistemas similares mostraron la importancia de las secuencias 5' UTR y 3' UTR para el mRNA de  $\alpha$ -amilasa de cebada (*Hordeum vulgare*) o el 5' UTR del transcripto que codifica la proteína Hsp70 (por *heat shock protein*; Pitto *et al.*, 1992, Gallie and Young 1994). Más recientemente, Hulzink y colaboradores reportaron que la región 5' UTR sería responsable de la activación traduccional del gen de tabaco *ntp303* (Hulzink *et al.*, 2002). Este gen codifica una glicoproteína de polen que es traducida eficientemente durante el crecimiento del tubo polínico. El gen de la glutamina sintasa citosólica de soja es otro caso de activación traduccional mediada por la región 5' UTR (Ortega *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que la regulación de la traducción por secuencias no traducidas tendría un rol relevante en la expresión génica durante procesos de crecimiento y desarrollo en plantas.



### 4.3. Regulación por sRNAs en plantas

Los sRNAs son moléculas de 20-24 nts que funcionan como reguladores transcripcionales o post-transcripcionales de la expresión génica. Hasta el momento se han identificado dos tipos principales de sRNAs en plantas: los miRNAs, y los *small interfering RNAs* (siRNAs; Axtell 2013). Estos sRNAs se clasifican en base a su biogénesis y su función. Los miRNAs provienen de transcriptos codificados en el genoma nuclear y que dan lugar a un RNA de cadena simple con estructuras de tipo tallo-rulo (*stem-loop*). Los siRNAs son generados a partir de RNAs de doble cadena o RNA con estructuras de orquilla (*hairpin RNA* o hpRNA) que pueden ser de origen endógeno o exógeno. Tanto los miRNAs como los siRNAs son procesados por RNAsas de tipo III, denominadas Dicer, que actúan sobre sustratos doble cadena para dar RNA dúplex de 20-24 nts con extremos 3' protuberantes de 2 nts. Los sRNAs doble cadena generados son separados para dar miRNAs o siRNAs de cadena simple durante su asociación a proteínas del complejo RISC (por **RNA-induced silencing complex**).

La biogénesis de los miRNAs se esquematiza en la Figura 4: comienza con la transcripción por RNA Pol II de un gen *MIR* para dar lugar a un miRNA primario (pri-miRNA), al cual se adiciona un *cap* en el extremo 5' y una cola de poliA (Figura 4). Los pri-miRNAs forman una estructura tipo *stem-loop* que es procesada por *Dicer like 1* (DCL1) en *Arabidopsis* para dar el precursor del miRNA (pre-miRNA; Park *et al.*, 2002). DCL1 continúa el procesamiento para dar un dúplex de RNA doble cadena de 20-22 nt entre el miRNA y su miRNA complementario (miRNA\*). DCL1 actúa en los *dicing bodies* dentro del núcleo (Fang and Spector 2007) junto con HYL1 (por *Hyponastic leaves 1*; Han *et al.*, 2004), una proteína de unión a RNA doble cadena y SE (por *Serrate*; Lobbes *et al.*, 2006), una proteína que contiene un dominio tipo *zinc finger*. El dúplex miRNA/miRNA\* es estabilizado por acción de una metil transferasa nuclear dependiente de S-adenosilmetionina, denominada HEN1 (por *Hua enhancer 1*), que metila el 2' OH de los extremos 3' (Yu *et al.*, 2005). El miRNA es exportado al citoplasma por la acción de factores de exportación, que incluyen la proteína HASTY, homóloga a la exportina-5 de mamíferos (Park *et al.*, 2005). El duplex miRNAs/miRNA\* se asocia a una proteína de la familia Argonauta (AGO) para dar un complejo denominado pre-RISC (Kawamata *et al.*, 2009). Luego dentro de este complejo se produce la separación de las hebras para dar un complejo RISC maduro que

contiene sólo la hebra miRNA o guía (Fagard *et al.*, 2000, Baumberger and Baulcombe 2005). Las exonucleasas de la familia de SDN1 (*Small RNA degrading nuclease*) degradan miRNAs de cadena simple, disminuyendo sus niveles estacionarios (Ramachandran and Chen 2008).

Los miRNAs pueden ejercer su modo de acción a través del clivaje de sus mRNAs blanco o bien por inhibición de su traducción. Los miRNAs de plantas poseen un apareamiento de bases perfecto o casi perfecto con sus mRNAs blanco, lo cual llevó a hipotetizar que los miRNAs actuaban exclusivamente por un mecanismo de clivaje del mRNA (Voinnet 2009). Dicho clivaje se produce en el enlace fosfodiéster opuesto a las posiciones décima y décimoprimeras del miRNA en el dúplex miRNA/mRNA y es llevado a cabo por la actividad endonucleasa de proteínas de la familia AGO. Posteriormente, distintas evidencias llevaron a proponer que los miRNAs de plantas también podrían inhibir la traducción de los mRNAs blanco. Estudios en los cuales se evaluaron simultáneamente los niveles de proteína y mRNA de algunos genes blanco de miRNAs revelaron cambios nulos o poco significativos a nivel de abundancia de mRNA, mientras que los niveles de proteína se reducían significativamente en presencia del miRNA. Algunos ejemplos incluyen a miR156/157, miR172 y miR398, cuyos genes blanco son SPL3 (*Squamosa Promoter Binding - like3*), el factor de transcripción APETALA2 y las superóxido dismutasas CDS1 y CDS2, respectivamente (Aukerman and Sakai 2003, Chen 2004, Bari *et al.*, 2006, Gandikota *et al.*, 2007). Posteriormente, la caracterización de las mutantes *mad* (*miRNA action deficient*) clase III, las cuales se encuentran comprometidas en la inhibición traduccional de los genes blanco, estableció la noción de que este modo de acción de los miRNAs es ubicuo y extenso en plantas (Brodersen *et al.*, 2008). Este estudio permitió concluir que la regulación de la expresión génica por miRNAs en plantas involucra tanto mecanismos de clivaje del mRNA como de inhibición de la traducción. La represión traduccional en Arabidopsis requiere de una proteína que interviene en la dinámica de microtúbulos asociados a miRNAs, KTN1, una proteína componente del complejo de *decapping* localizado en los P *bodies*, VARICOSE y de una proteína con repeticiones ricas en glicina y triptofano (GW) que colocaliza también con los P *bodies* (Brodersen *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2012). En sistemas animales, las proteínas con dominios GW pueden asociarse a AGO y mediar la represión traduccional (Eulalio *et al.*, 2009). Asimismo, en Arabidopsis se detectaron miRNAs maduros y la proteína AGO1 en las fracciones de polisomas

purificados mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (Lanet *et al.*, 2009). Más recientemente, el grupo de Li y colaboradores reportaron que una proteína integral de membrana de *Arabidopsis*, denominada AMP1 (por *altered meristem program 1*), es requerida para la represión traduccional de mRNAs que se traducen en el retículo endoplásmico (Li *et al.*, 2013).

Otra clase de sRNAs derivados de la acción de miRNAs son los denominados tasiRNAs (por *trans acting small interfering RNA*) que participan, a su vez, en la regulación post-transcripcional de otros mRNAs blanco. Este tipo de sRNA, identificados sólo en plantas, es producido a partir del clivaje guiado por miRNAs de los transcriptos no codificantes *TAS*. Los ejemplos conocidos incluyen a miR173, que dirige la producción de tasiRNAs a partir de *TAS1* y *TAS2*, miR390, que dirige la producción de tasiRNAs a partir de *TAS3* y miR828, que produce tasiRNAs a partir de *TAS4*. En los casos de *TAS1*, *TAS2* y *TAS4*, el miRNA que dispara la producción de tasiRNAs tiene un único sitio de unión al mRNA, mientras que miR390 presenta dos sitios de unión a *TAS3*, aunque sólo se produce clivaje en el sitio más próximo al 3' del mRNA. A diferencia de los otros complejos RISC, que involucran a la proteína AGO1, miR390 se asocia a AGO7. Los productos del clivaje, hacia la región 3' a partir del corte para *TAS1*, *TAS2* y *TAS4* y hacia la región 5' en el caso de *TAS3*, son estabilizados por una RBP, SGS3 (*supressor of gene silencing 3*) y copiado a doble cadena por la RNA polimerasa dependiente de RNA RDR6. Este dúplex es clivado secuencialmente en una fase de 21 nts a partir del sitio de corte inicial por la RNasa de tipo III DCL4. Los tasiRNAs se asocian a una de las proteínas AGO para ejercer su acción. Los tasiRNAs derivados de *TAS1*, *TAS2* y *TAS4* ejercen el clivaje de los transcriptos que codifican proteínas con repeticiones de pentatricopéptido (PRR; Yoshikawa *et al.*, 2005) y factores de transcripción del tipo MYB (Rajagopalan *et al.*, 2006), mientras que *TAS3* da lugar a los tasiRNAs denominados tasiARFs, cuyos blancos son los mRNAs de los factores de respuesta auxina (ARF) *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* (Cuperus *et al.*, 2010). Un esquema de la vía de biosíntesis de miR390, su modo de acción para la producción de los tasiARFs y la acción de estos últimos sobre los transcriptos *ARFs* se presenta en la Figura 6. Estudios en hojas de *Arabidopsis* mostraron que los tasiARFs pueden movilizarse intercelularmente desde las células en donde se sintetizan, en la cara adaxial de las hojas, hasta la cara abaxial (Chitwood *et al.*, 2009). Esto permite la generación de un gradiente que promueve la identidad abaxial (Chitwood *et al.*, 2009). Estudios

llevados a cabo en raíces de *Arabidopsis* mostraron que miR390 se expresa principalmente en los sitios de iniciación de las raíces laterales, donde produce la biogénesis de tasiARFs y la inhibición de sus blancos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, promoviendo así el crecimiento de las raíces laterales (Marin *et al.*, 2010).

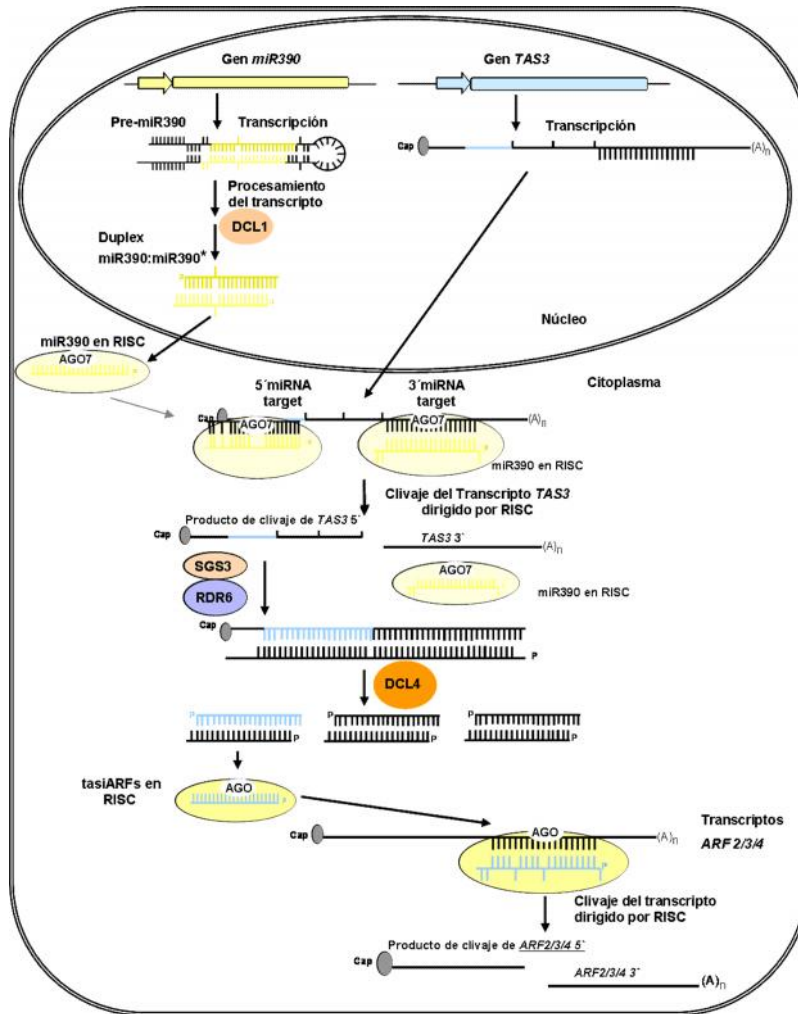


Figura 6. Esquema de la biogénesis de miR390 y de su acción para la producción de tasiARFs. El gen de miR390 se transcribe para dar un precursor que es procesado por DCL1 (*Dicer like 1*) dando lugar al miR390 maduro, el cual se asocia con la proteína AGO7. Este complejo se une en dos regiones del transcripto no codificante *TAS3* y se produce su clivaje. El producto 5' de este RNA es reclutado por el complejo RDR6/SGS3, donde RDR6 sintetiza la segunda cadena de RNA para dar lugar a un RNA doble cadena, el cual es procesado por DCL4 para producir los tasiARFs. Estos tasiRNAs se asocian a AGO1 y actúan sobre los mRNAs blancos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*.

Más recientemente se detectó la presencia de miRNAs de 22 nts que guían la producción de una nueva clase de sRNA, denominados phasiRNAs (*phased registered small interfering RNA*; Zhai *et al.*, 2011). Al igual que los tasiRNAs, los phasiRNAs son producidos por el clivaje dirigido por miRNAs en fase a partir del sitio de corte. A diferencia de los tasiRNAs, los phasiRNAs regulan transcritos codificantes para las proteínas de defensa con dominios de unión a nucleótido (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Los phasiRNAs son altamente abundantes en leguminosas y fueron identificados en arroz (*Oryza rufipogon*), pero hasta el momento no han sido detectados en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2013). En *M. truncatula*, 3 miRNAs regulan la expresión de más de 70 NBS-LRR mediante la producción de phasiRNAs. A su vez los phasiRNAs

producidos pueden regular la expresión de otros NBS-LRR, lo que permitiría que unos pocos miRNAs puedan regular los niveles de expresión de distintos miembros de una extensa familia génica (Axtell 2013).

#### 4.4. Funciones de los miRNAs en la nodulación

En los últimos años se han identificado y caracterizado miRNAs involucrados en el desarrollo del nódulo. El primero de ellos es el miR169a de *M. truncatula*, el cual controla la expresión del factor de transcripción *NF-YAI* involucrado en la persistencia del meristema del nódulo. Tanto la sobreexpresión de miR169a como el silenciamiento de *NF-YAI* mediado por RNA de interferencia, dio lugar a la formación de nódulos de tamaño reducido e incapaces de fijar nitrógeno (Combier *et al.*, 2006). Los patrones de expresión espacial mostraron que miR169 restringiría la expresión de *NF-YAI* a la zona meristemática. Por otro lado el factor de transcripción HD-ZIP (por *homeodomain-leucine zipper*) de clase III, involucrado con el desarrollo del nódulo, es regulado por miR166 (Boualem *et al.*, 2008). Ambos RNAs se expresan en haces vasculares y en las regiones apicales de raíces y nódulos. La sobreexpresión de miR166 causó la reducción del número de nódulos y de las raíces laterales, así como también el desarrollo ectópico de los haces vasculares (Boualem *et al.*, 2008). Recientemente se correlacionó al miR171 con la infección bacteriana mediante estudios de expresión en *L. japonicus*. miR171 se acumula en nódulos y tiene como mRNA blanco al factor de transcripción *NSP2* (De Luis *et al.*, 2012). La sobreexpresión de varios miRNAs en soja, entre ellos miR482, miR1512 y miR1515, resultó en una mayor producción de nódulos sin afectar el desarrollo de la raíz (Li *et al.*, 2010). Los mRNAs blanco de estos miRNAs incluyen a proteínas de defensa para miR482, una quinasa de Ser/Thr para miR1512, y una posible DCL para miR1515. A diferencia de estos últimos, la sobreexpresión de miR160, cuyo mRNAs blanco codifican los represores transcripcionales *ARF10/16/17*, redujo significativamente la formación de primordios nodulares en raíces de soja (Turner *et al.*, 2013).

## **5. Herramientas para el estudio de la expresión génica en tipos celulares específicos**

Los niveles de regulación descritos en la sección anterior contribuyen a la expresión génica dentro de la célula. En un contexto más amplio, cada órgano de la planta (hojas, raíz, tallo, flores, semillas) está compuesto de múltiples tejidos (meristemas, células en crecimiento, células maduras), que a su vez contienen distintos tipos celulares. En un ambiente dinámico, cada célula funciona en procesos especializados que en conjunto determinan el crecimiento y desarrollo del organismo. Para poder alcanzar una mayor comprensión de los procesos que determinan este comportamiento se requiere de tecnologías que permitan discriminar la contribución de los diferentes tipos de regulación en el contexto de cada tipo celular.

Los métodos para el estudio de la expresión génica en tipos celulares o tejidos específicos se pueden clasificar en aquellos realizables a baja escala y los que se pueden realizar a gran escala o escala genómica. El patrón de expresión tisular o celular de los transcritos individuales es evaluado mediante técnicas de hibridación *in situ* o bien mediante el uso de promotores de los genes de interés fusionados transcripcionalmente a genes reporteros, como  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) o la proteína verde fluorescente (GFP por *Green Fluorescent Protein*). Esta última aproximación metodológica permite a su vez evaluar también la localización subcelular de la proteína, si se utilizan fusiones traduccionales de los genes reporteros con la proteína de interés bajo su promotor endógeno. Por otra parte, los métodos a escala genómica permiten analizar simultáneamente todos o casi todos los genes expresados en una especie determinada, utilizando las tecnologías de hibridación a microarreglos de DNA o de secuenciación masiva del RNA. Para analizar la expresión de genes en tejidos específicos o tipos celulares de interés se han desarrollado tecnologías basadas en la microdissección láser (LCM por *Laser Capture Microdissection*). Esta técnica ha sido utilizada para obtener los mRNAs y sRNAs de células individuales, y se plantea la posibilidad de aplicarse al análisis de la cromatina y los complejos RNPs nucleares o citosólicos (Bailey-Serres 2013). Los tejidos deben ser fijados, congelados y seccionados como un paso previo a la disección con el láser, lo que limita la evaluación de procesos dinámicos. Otras metodologías para aislar tipos celulares individuales hacen uso de la citometría de flujo, permitiendo la separación de células o núcleos que expresan una proteína fluorescente (FACS por *fluorescence-activated cell sorting*). Dado que las células vegetales poseen

pared celular, la aplicación de FACS a tejidos vegetales requiere de la preparación de protoplastos, los cuales son a continuación separados mediante un citómetro de flujo (Birnbaum *et al.*, 2005). Este procedimiento fue utilizado para analizar los patrones de expresión de tipos celulares específicos en la raíz de *Arabidopsis* (Birnbaum *et al.*, 2003). Los análisis de los tipos celulares específicos en distintos estadios del desarrollo o durante condiciones de estrés mostraron que numerosos mRNAs que codifican factores de transcripción son regulados espacial y temporalmente durante el crecimiento o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Brady *et al.*, 2007).

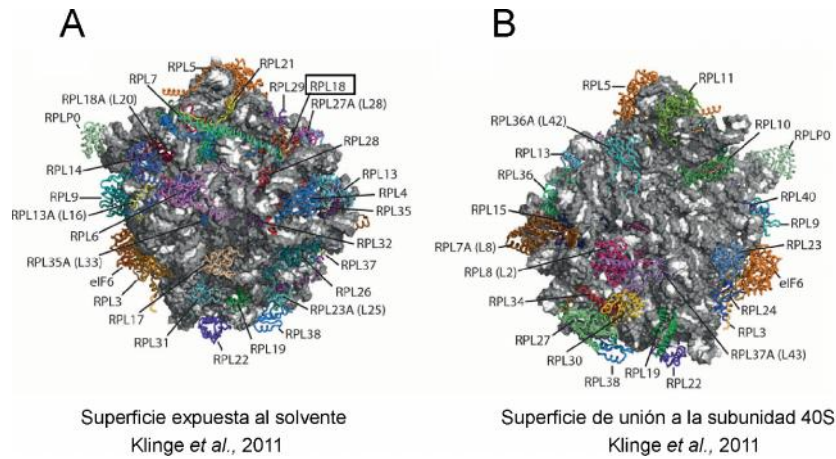
Los métodos mencionados hasta el momento permiten la cuantificación de los niveles estacionarios de mRNA. Una técnica alternativa que permite investigar a su vez el nivel de regulación post-transcripcional es aquella basada en la inmunopurificación de RNA (RIP por *RNA immunopurification*). Esta metodología, también conocida como ribonómica, permite acceder a las poblaciones de RNAs específicos asociados a una RBP. Ejemplos de RIP incluyen aquellos llevados a cabo con las proteínas PABP o el eIF4E, que se unen a los mRNAs poliadenilados o al *cap* del extremo 5' de los mRNAs, respectivamente (Tenenbaum *et al.*, 2000, Tenenbaum *et al.*, 2002). Otra utilidad de esta metodología es el uso combinado de RIP con nucleasas que permiten ubicar la región protegida por una RBP, tal como fue realizado para 40 RBP de levaduras (Hogan *et al.*, 2008). Esta metodología también puede ser utilizada para purificar mRNAs asociados a una RBP en tipos celulares específicos (Roy *et al.*, 2002, Kunitomo *et al.*, 2005, Takayama *et al.*, 2010).

Como se mencionó previamente la expresión génica es regulada a múltiples niveles, entre los cuales se destaca la regulación del inicio de la traducción (Branco-Price *et al.*, 2005, Kawaguchi and Bailey-Serres 2005). El número de ribosomas cargados en el transcripto es representativo del balance de las velocidades de iniciación, elongación y terminación de la traducción. La ultracentrifugación diferencial en gradientes de sacarosa es el método de rutina utilizado para la purificación y separación de complejos de mRNA-ribosomas de diferente tamaño basándose en sus coeficientes de sedimentación. El fundamento del método de separación lleva a que las muestras de polisomas purificadas contengan también otros complejos de alto coeficiente de sedimentación, tales como pseudo-polisomas, cuerpos de procesamiento y gránulos de almacenamiento entre otros mRNPs (Fleischer *et al.*, 2006, Thermann and Hentze 2007, Halbeisen and Gerber 2009). Más recientemente, se han desarrollado métodos basados

en la purificación por afinidad o inmunopurificación de ribosomas en traducción (TRAP, por *Translating Ribosome Affinity Purification*). El método de TRAP consiste en la adición de un pequeño epítopo al extremo de una proteína ribosomal que permite la purificación por afinidad del complejo, sin afectar el ensamblado y la función de los ribosomas o la formación de polisomas. Previamente, la técnica de TRAP había sido utilizada para la purificación de ribosomas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante una fusión de la proteína ribosomal de la subunidad grande RPL25 (por *Ribosomal protein large subunit 25*), a un epítopo FLAG-His (Inada *et al.*, 2002). En la primera prueba de concepto de esta metodología en plantas, se seleccionaron proteínas ribosomales que pertenecen a la subunidad 60S, para llevar adelante la purificación de ribosomas que excluyan al complejo de preiniciación 43S (Zanetti *et al.*, 2005). El uso de una proteína ribosomal de la subunidad 60S asegura que los mRNAs purificados en estos complejos contienen al menos un ribosoma 80S que superó la etapa de iniciación. Las proteínas seleccionadas en ese estudio, RPL7B, RPL12A, RPL18B y RPL23A contienen regiones N-terminal o C-terminal localizados en la periferia del ribosoma, asegurando la exposición del epítopo a la superficie del ribosoma (Figura 7; Zanetti *et al.*, 2005). El mayor rendimiento de purificación se obtuvo a partir de plantas transgénicas expresando RPL18B fusionada en su N-terminal a un epítopo dual His-FLAG. Los complejos inmunopurificados contenían rRNA, mRNA y proteínas de ribosomas citosólicos (Zanetti *et al.*, 2005). El desarrollo de este método ha facilitado la purificación y análisis de los mRNAs asociados a ribosomas (traductoma), y a diferencia del método convencional de purificación de polisomas, la técnica de TRAP no requiere de equipamiento especializado. Posteriormente, la técnica de TRAP fue utilizada para comparar los cambios en el transcriptoma versus los cambios en el traductoma (conjunto de mRNAs asociados a la maquinaria traduccional) en plantas sometidas a diferentes estímulos ambientales o durante distintos estadios de desarrollo (Branco-Price *et al.*, 2008, Jiao and Meyerowitz 2010, Juntawong and Bailey-Serres 2012, Ribeiro *et al.*, 2012). Estos estudios pusieron de manifiesto la importancia del nivel de regulación traduccional durante estos procesos. La técnica de TRAP fue adaptada y utilizada también para caracterizar los traductomas de tipos celulares específicos mediante el uso de promotores que dirigen la expresión de la proteína FLAG-RPL18 (Mustroph *et al.*, 2009b, Jiao and Meyerowitz 2010). Este sistema permite la cuantificación del estado traduccional de los mRNAs en cada tipo celular. Posee como ventaja, respecto a los métodos FACS o LCM, que no se requiere la



generación de protoplastos o la disección del tejido y es efectivo también para órganos fotosintéticos. Además, al purificar ribosomas que ya contienen FLAG-RPL18, se pueden cuantificar cambios rápidos en la traducción en respuesta a un estímulo ambiental.



**Figura 7. Estructura tridimensional de la subunidad mayor 60S del ribosoma eucariota en el esquema mostrado por Klinge *et al.*, 2011.** Las estructuras corresponden a la subunidad 60S de *Tetrahymena thermophila*. **A.** Vista de la superficie expuesta al solvente donde se recuadra la proteína RPL18 utilizada para la técnica de TRAP en *Arabidopsis*. **B.** Vista de la superficie de unión a la subunidad 40 S. Las proteínas fueron dibujadas como cintas.

Una técnica más sofisticada que permite monitorear la eficiencia traduccional con mayor detalle es conocida como Ribo-seq (*ribosome profiling sequencing*). Ribo-seq se basa en la inmovilización de los ribosomas en los mRNAs por tratamiento con cicloheximida (Ingolia *et al.*, 2012) y la digestión del mRNA con nucleasas que degradan las secuencias no protegidas por el ribosoma. Los fragmentos protegidos (de aproximadamente 33 nts) son secuenciados mediante tecnologías de última generación, de manera de identificar la posición que ocupan los ribosomas sobre cada mRNA individual. Esta técnica fue desarrollada inicialmente en levaduras, y luego aplicada también a líneas celulares humanas y del pez cebra (*zebrafish*) para evaluar el impacto de los miRNAs en la degradación de transcritos y su represión traduccional (Bazzini *et al.*, 2012, Djuranovic *et al.*, 2012).

## ***Hipótesis y Objetivos***

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios genéticos han sido muy exitosos en la identificación de genes involucrados en distintas etapas de la simbiosis y han permitido caracterizar buena parte de la vía de señalización que desencadena el programa morfogénico de la nodulación. Sin embargo, se requiere la identificación de otros componentes adicionales para enriquecer el conocimiento sobre esta vía de señalización. En este sentido, la redundancia génica constituye un obstáculo para la identificación de nuevos componentes mediante el análisis de mutantes afectadas en la nodulación. Por otra parte, numerosos estudios han abordado el análisis de los transcriptomas en las leguminosas modelo *M. truncatula* y *L. japonicus* contribuyendo a identificar nuevos genes involucrados en el proceso asociativo (Lohar *et al.*, 2006, Benedito *et al.*, 2008, Hogslund *et al.*, 2009, Madsen *et al.*, 2010). Sin embargo, los niveles estacionarios de mRNAs no siempre muestran una buena correlación con los niveles de las proteínas que éstos codifican. Se ha señalado que otros niveles de regulación que incluyen la distribución dinámica de los mRNAs entre complejos traduccionales, de almacenamiento y de degradación, así como también la degradación de proteínas contribuyen a esta falta de correlación (Hellmann and Estelle 2002, Kawaguchi *et al.*, 2004). Además, los estudios de transcriptomas utilizando órganos completos no han permitido distinguir la contribución de cada uno de los tipos celulares individuales contenidos dentro de las raíces de leguminosas en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Las hipótesis principales del presente trabajo de tesis son que la regulación a nivel de la traducción contribuye significativamente a modular la expresión génica durante la simbiosis con rizobios y, a su vez, que cada tipo celular de la raíz contribuye diferencialmente a estos cambios globales. Asimismo, también hipotetizamos que los sRNAs podrían tener un rol regulatorio de la traducción durante la nodulación.

En base a ello, el objetivo general de este trabajo de tesis fue caracterizar los cambios en los mRNAs y pequeños RNAs asociados a la maquinaria traduccional, tanto a nivel de la raíz completa, como de los tipos celulares involucrados en los eventos tempranos de la nodulación. Para ello se utilizó la interacción simbiótica establecida entre *M. truncatula* y su par simbiótico *Sinorhizobium meliloti*.

Para alcanzar el objetivo general, en este trabajo de tesis nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1- Poner a punto la técnica de purificación por afinidad de polisomas en raíces de *M. truncatula*.

2- Caracterizar los cambios en la asociación a polisomas de mRNAs involucrados en la vía de señalización de la nodulación en etapas tempranas de la asociación simbiótica *M. truncatula*- *S. meliloti*.

3- Analizar la respuesta de cada tipo celular a nivel de la asociación de los mRNAs a los polisomas durante la asociación simbiótica.

4- Investigar la asociación de sRNAs a la maquinaria traduccional en raíces de *M. truncatula* y los cambios en dicha asociación en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.

## Capítulo I. Optimización de la purificación por afinidad de ribosomas involucrados en traducción (TRAP) en *Medicago truncatula*

Con el fin de estudiar la contribución de la regulación traduccional a la expresión génica durante la simbiosis entre leguminosas y rizobios se seleccionó la especie modelo *M. truncatula* para desarrollar la técnica de TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*). Esta técnica desarrollada previamente en *Arabidopsis* permite la purificación por afinidad de ribosomas en traducción (Zanetti et al., 2005). A diferencia de la purificación mediante gradientes de sacarosa, TRAP permite aislar los complejos ribosomales tanto de órganos completos como de tipos celulares específicos sin requerir de equipamiento especializado. En base a los estudios en *Arabidopsis* se decidió utilizar la proteína ribosomal RPL18 de *M. truncatula* para poner a punto la técnica de TRAP en esta leguminosa. Para identificar la proteína RPL18 de *M. truncatula* se realizó una búsqueda en la base de datos genómica de *M. truncatula* utilizando la secuencia de aminoácidos de RPL18B de *Arabidopsis* y el algoritmo *BLASTp*. Se identificaron las proteínas codificadas por los genes Medtr1g083460 y Medtr7g112880, las cuales presentaron 83,96 % ( $E=7e^{-112}$ ) y 80,75 % ( $E=3e^{-110}$ ) de identidad con la proteína de *Arabidopsis*, respectivamente (Figura 8).

```

Medtr1g083460.1 1 MGIDLKAGGK■NKKTKRTAPKSNDIYLKLLVKLYRFLVRR■TGSNFNNAVILKRLFMSKV■NKP
Medtr7g112880.1 1 MGIDLKAGGKSK■NTKRTEPKSNDIYLKLLVKLYRFLVRR■TDSNFNNAVILKRLFMSKV■NRP
At_RPL18B 1 MGIDL■L■AGGKSKKTKRTAPKSD■DDVYLKLLVKLYRFLVRR■TNSKFN■GVILKRLFMSKV■NKA

Medtr1g083460.1 61 PLSLSRLIK■VTNGKEGKIAVVVGAITDDV■RVNEVPATKVTALRFT■ERARARIE■SAGGECL
Medtr7g112880.1 61 PISLSKMI■EYMKGKIDGKI■GVVVGAVTDDIRVYE■VPV■LK■IAALRFT■ERARARIEKAGGECL
At_RPL18B 61 PLSLSRL■VE■FM■TGKBD■KI■AV■IVG■ITDDLRV■HE■IPAMKVTALRFT■ERARARIEKAGGECL

Medtr1g083460.1 121 TFDQLALRAPLQNTVLLRGPKNAREAVKHFG■GRAPGV■PSH■TKPYVR■GK■SR■KIEKARGKR
Medtr7g112880.1 121 TFDQLALRAPLQNTVLLRGPKNAREAVKHFG■GRAPGV■PHSH■SKPYVR■SKGR■QEKARGKR
At_RPL18B 121 TFDQLALRAPLQNTVLLRGPKN■SREAVKHFG■CPAPGVPHSH■SKPYVR■AKGR■KFEKARGKR

Medtr1g083460.1 181 KSRGFRV■
Medtr7g112880.1 181 KSRGFRV■
At_RPL18B 181 KSRGF■KV■

```

**Figura 8. Alineamiento de la proteína RPL18B de *Arabidopsis* y sus homólogas de *M. truncatula*.** Las secuencias presentadas corresponden a la proteína At\_RPL18B codificada por el gen At3g05590.1 y a sus homólogas de *M. truncatula* codificadas por los genes Medtr1g083460.1 y Medtr7g112880.1. Los residuos encuadrados en negro indican residuos idénticos, mientras que las sustituciones conservativas se remarcan en gris. Los alineamientos fueron generados con ClustalW utilizando el método *neighbor-joining* y formateados con BOXSHADE.

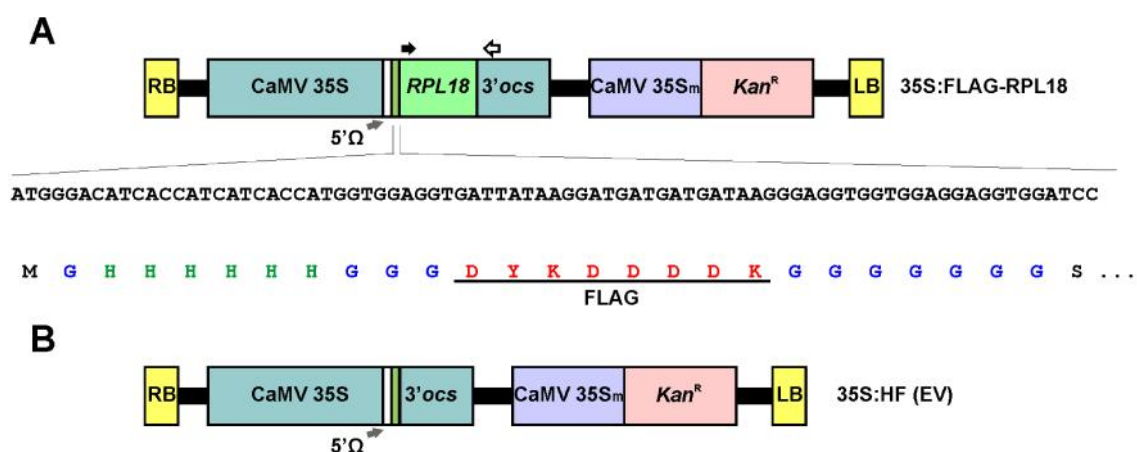
Con el objetivo de seleccionar uno de los dos genes candidatos se analizaron los niveles estacionarios de los transcritos correspondientes. Para ello, se utilizó la información disponible en el *Gene Expression Atlas* de *M. truncatula* (<http://mtgea.noble.org/v2/>), el cual contiene datos de transcriptomas de distintos

órganos y en diversas condiciones ambientales (Benedito *et al.*, 2008). Los identificadores Mtr.52082.1.S1\_at y Mtr.42955.1.S1\_at del microarreglo de Affymetrix “*Medicago* Gene Chip” corresponden a los genes Medtr1g083460 y Medtr7g112880, respectivamente. Ambos genes presentan niveles de transcripto detectables en todos los órganos y en todas las condiciones analizadas. En la Figura 9 se muestran los datos correspondientes a flores, hojas, tallos, raíces y nódulos. Estos datos indican que los transcriptos de ambos genes se acumulan en forma ubicua en *M. truncatula*. Sin embargo, es de destacar que Medtr1g083460 presenta mayores niveles de mRNA que Medtr7g112880 en los tejidos analizados. Además las mayores diferencias de expresión entre ambos genes se detectaron en raíz y en nódulos de 4 días post-inoculación. Medtr1g083460 presenta los mayores niveles de mRNA en raíz que corresponde al tejido donde se buscó realizar TRAP. Además, este gen codifica la proteína que posee la mayor similitud con la proteína ribosomal de *Arabidopsis*. A partir de este análisis se seleccionó este gen para desarrollar la técnica de TRAP en *M. truncatula*.



**Figura 9. Niveles estacionarios de transcriptos de los genes que codifican RPL18 en *M. truncatula*.** Los datos fueron obtenidos del *M. truncatula* Gene Expression Atlas (<http://mtgea.noble.org/v2/>). Los valores del eje y representan la señal normalizada correspondiente a los identificadores Mtr.52082.1.S1\_at (en azul) y Mtr.42955.1.S1 (en rojo) presentes en el microarreglo Affymetrix *Medicago* Gene Chip correspondientes a los genes Medtr1g083460 y Medtr7g112880, respectivamente. Las muestras corresponden a flores, hojas, tallos, raíces y nódulos formados en *M. truncatula* a los 4, 10, 14 y 28 días luego de la inoculación con *S. meliloti*.

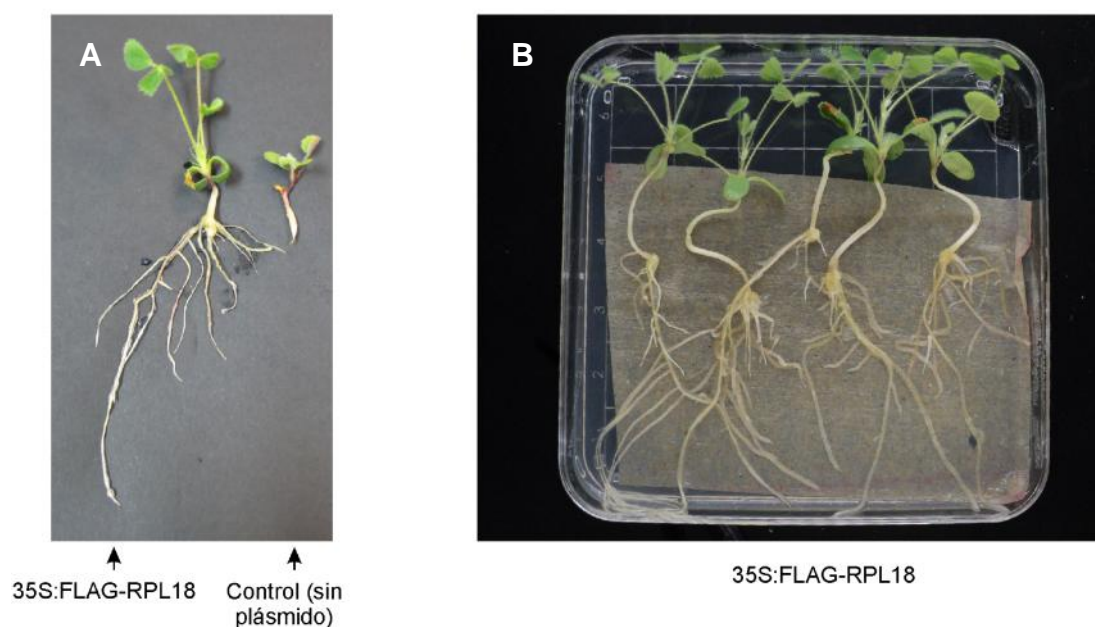
En base a la secuencia de nucleótidos del gen Medtr1g083460 se diseñaron *primers* para amplificar por PCR el marco abierto de lectura utilizando cDNA de raíz como DNA molde. El producto de PCR purificado fue clonado en el vector binario p35S:HF (EV) (Zanetti *et al.*, 2005) para obtener la construcción 35S:FLAG-RPL18. La construcción consta del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV 35S), seguido de la secuencia 5' no traducida  $\Omega$  del virus del mosaico del tabaco. A continuación se encuentra el sitio de inicio de la traducción seguido por un epítipo dual conteniendo seis residuos de histidina, un espaciador, el epítipo FLAG y un segundo espaciador previo a la proteína ribosomal. Este último espaciador provee la flexibilidad que facilita la exposición del epítipo FLAG. Finalmente se encuentra la región 3' no traducida del gen de la octopina sintasa (*ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 10). La secuenciación de los plásmidos confirmó la obtención de la construcción esperada (ver la secuencia en el Anexo I).



**Figura 10. Regiones del T-DNA de los plásmidos utilizados para desarrollar TRAP en *M. truncatula*** **A.** Construcción 35S:FLAG-RPL18 que contiene las secuencias de los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA, el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor completo (CaMV 35S) o mínimo (CaMV 35Sm), las regiones no traducidas 5' y 3' *ocs*, y el gen *nptII*, que confiere la resistencia a kanamicina (*Kan<sup>R</sup>*). Se amplió la región de epítopos fusionada a RPL18. Se presenta la secuencia de DNA y el péptido codificado por esa región. En azul se destacan los residuos glicina, en verde los de histidina y en rojo los correspondientes al epítipo FLAG. Las flechas negra y blanca indican las regiones de los *primers* RPL18 fwd y 3'ocs rev, respectivamente. **B.** Construcción utilizada como control 35S:HF (EV, *empty vector*) en la que se expresa sólo el epítipo dual que se amplió en la parte A de la figura.

Dado que la simbiosis fijadora de nitrógeno es un proceso que en la mayoría de las especies leguminosas, y en particular en *M. truncatula*, se desarrolla en la raíz se decidió utilizar el método de transformación de raíces mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). La infección con esta bacteria permite la generación de plantas compuestas las cuales poseen raíces transgénicas y parte aérea *wild type*. Este método de transformación es ampliamente utilizado en estudios de

simbiosis en la raíz y se ha empleado con éxito en la complementación de mutantes, tanto en nodulación como en micorrización arbuscular (Boisson-Dernier *et al.*, 2001, Ane *et al.*, 2004, Gobbato *et al.*, 2012). Las raíces transformadas son seleccionadas en un medio que contiene el antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra codificada dentro del T-DNA transferido a las raíces (Figura 11A). Posteriormente se retira la selección de aquellas plantas que formaron raíces para favorecer el desarrollo del sistema radical (Figura 11B). La eficiencia de transformación obtenida con las construcciones 35S:FLAG-RPL18 o control 35S:HF fue cercana al 65 %, porcentaje similar al obtenido por los autores que describen la técnica (Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

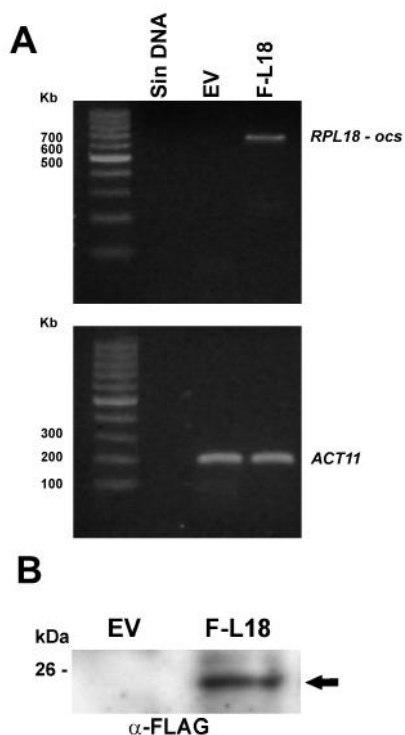


**Figura 11.** Obtención de plantas compuestas de *M. truncatula* por transformación con *A. rhizogenes*. **A.** Selección con kanamicina de las raíces transgénicas. A la izquierda se muestra una planta de *M. truncatula* cuyas raíces contienen la construcción 35S:FLAG-RPL18, mientras que a la derecha se observa una planta infectada con *A. rhizogenes* sin plásmido binario luego de la selección en medio agar-Fahraeus con kanamicina durante 2 semanas. **B.** Desarrollo del sistema radical de las plantas transformadas una semana luego de la selección.

A partir de las plantas compuestas generadas se realizó una extracción de RNA de tejido de raíz para verificar la expresión del transcripto de RPL18 mediante transcripción reversa (RT) seguida de PCR. La amplificación se realizó utilizando un *primer* del inicio de la región codificante de *RPL18* y otro dentro de la región 3'UTR *ocs* (ver Figura 10). Se detectó un producto de amplificación del tamaño esperado en la muestra obtenida de raíces transformadas con 35S:FLAG-RPL18 y no así en la muestra de las raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (Figura 12A). Por otro lado, se evaluó la expresión de la proteína FLAG-RPL18 en las raíces transformadas mediante



*Western Blot* utilizando anticuerpos comerciales que reconocen el péptido FLAG. En estos ensayos se detectó una proteína con la movilidad electroforética esperada para la proteína de fusión FLAG-RPL18 (aproximadamente 25 kDa) en los extractos proteicos de raíces transformadas con la construcción 35S:FLAG-RPL18, pero no de aquellas raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (Figura 12B).

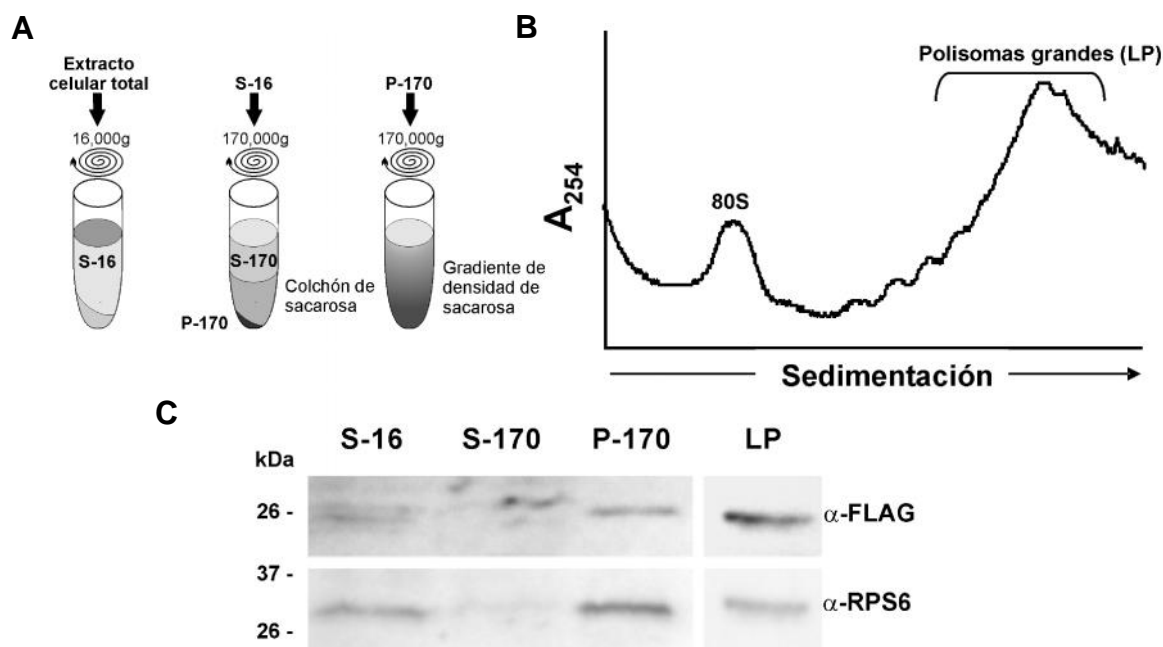


**Figura 12. Evaluación de la expresión de FLAG-RPL18 en raíces de plantas compuestas A.** En el panel superior se muestra la detección del transcripto *FLAG-RPL18-OCS*. El RNA total de raíces transformadas con el vector 35S:HF (EV) o con 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) fue sometido a una reacción de RT-PCR semicuantitativa para amplificar el transcripto que corresponde al transgén. Se utilizó el *primer RPL18 fwd* ubicado al inicio de la región codificante de *RPL18* y el *primer 3'ocs rev* ubicado en la región 3' *ocs* indicados en el esquema de la Figura 10A. El tamaño esperado corresponde a 646 pb. En el panel inferior se muestra la amplificación de un fragmento del tamaño correcto para el transcripto de *ACTINA11 (ACT11)* a partir de las mismas muestras. La calle Sin DNA corresponde al control de amplificación sin templado y el marcador de peso molecular se indica a la izquierda. **B.** Detección de la proteína FLAG-RPL18 mediante ensayos de *Western blot*. Extractos proteicos de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (EV) o con la construcción 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) fueron separados en un SDS-PAGE 15 % (p/v), y analizados por inmunoblot con anticuerpos dirigidos contra el péptido FLAG (-FLAG). La flecha indica la señal cuya movilidad electroforética corresponde a la esperada para la proteína FLAG-RPL18. La masa molecular se indica en kDa.

En un análisis posterior se evaluó la incorporación de la proteína FLAG-RPL18 en los complejos ribosomales. Con este fin, los extractos de raíces transgénicas fueron ultracentrifugados en un colchón de sacarosa 1,7 M para obtener el precipitado ribosomal, el que una vez resuspendido fue separado y fraccionado por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa 20-60 % (p/v) (Figura 13A). Las fracciones separadas según su coeficiente de sedimentación permitieron detectar la presencia de monosomas y polisomas (Figura 13B). Un anticuerpo que reconoce la proteína ribosomal de la subunidad menor S6 (RPS6) de diferentes especies vegetales (Williams *et al.*, 2003) fue utilizado como marcador de las fracciones ribosómicas y polisómicas mediante *Western blot*. La proteína S6 fue detectada en el extracto proteico total, el precipitado de ribosomas y en los polisomas de mayor tamaño, es decir mRNAs unidos a 5 o más ribosomas (Figura 13C). La presencia de la proteína de fusión FLAG-RPL18 fue detectada por *Western Blot* en el extracto total, en el precipitado ribosomal y

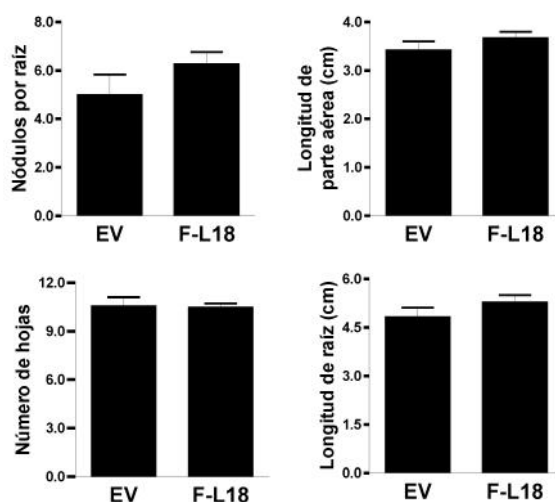


en la fracción conteniendo polisomas de mayor tamaño, al igual que S6, pero no en las fracciones que contenían el sobrenadante post-ribosomal. Este resultado indica que la proteína FLAG-RPL18 se incorpora eficientemente a los complejos ribosomales, confirmando la funcionalidad del gen seleccionado como candidato para la técnica de TRAP.



**Figura 13. Incorporación de la proteína FLAG-RPL18 en los complejos ribosomales de las raíces de *M. truncatula*.** A. Los ribosomas fueron obtenidos mediante ultracentrifugación de extractos totales (S-16) de raíces transformadas con 35S:FLAG-RPL18 en un colchón de sacarosa 1,7 M para obtener el sobrenadante post-ribosomal (S-170) y el precipitado ribosomal (P-170). Posteriormente P-170 fue fraccionado por ultracentrifugación diferencial en gradiente de densidad de sacarosa de 20-60 % (p/v). B. Perfil de absorbancia a 254 nm (A<sub>254</sub>) correspondiente a las fracciones obtenidas luego del gradiente de sacarosa. Se indican las posiciones correspondientes a monosomas (80S) y polisomas grandes (5 ribosomas). Se colectó la fracción correspondiente a polisomas grandes (fracción LP). C. Análisis de las fracciones S-16, S-170, P-170 y LP mediante *Western blot* con anticuerpos contra el péptido FLAG (α-FLAG) o contra la proteína ribosomal S6 (α-RPS6). La masa molecular del marcador se indica a la izquierda en kDa.

Para evaluar un posible impacto de la sobreexpresión de FLAG-RPL18 en el crecimiento de la planta, se evaluó la longitud de la raíz y de la parte aérea, el número de hojas y el número de nódulos desarrollados a 15 días luego de la inoculación con *S. meliloti*. Las plantas que expresan FLAG-RPL18 presentaron un fenotipo de desarrollo y nodulación similar al observado en las plantas transformadas con el vector vacío 35S:HF, tal como lo demuestran los análisis presentados en la Figura 14. Este resultado es similar al descrito previamente en *Arabidopsis*, donde las plantas transgénicas que expresan el gen RPL18B fusionado al epítipo FLAG no presentaron alteraciones fenotípicas (Zanetti *et al.*, 2005).



**Figura 14. Evaluación fenotípica de plantas transformadas con el vector vacío 35S:HF (EV) y p35S:FLAG-RPL18 (F-L18).** El número de nódulos por raíz formados en plantas compuestas crecidas en macetas conteniendo perlita:arena en una relación 4:1 fue evaluado luego de 15 días de la inoculación con *S. meliloti*. El número de hojas, la longitud de parte aérea y la longitud de la raíz fueron cuantificados en plantas compuestas de 4 semanas. Las barras representan la media  $\pm$  el desvío estándar. Los resultados corresponden a un experimento realizado con un mínimo de 20 plantas, representativo de tres réplicas biológicas.

Para evaluar si las raíces de las plantas compuestas que expresan FLAG-RPL18 responden normalmente a la inoculación con rizobio, se cuantificaron los niveles de los transcritos de las nodulinas tempranas *ENOD11*, *ENOD12*, *ENOD40* y del receptor de citoquininas *CRE1* por medio de transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Los transcritos elegidos forman parte de las respuestas a nivel molecular que se desencadenan como consecuencia de la percepción del rizobio y se encuentran en mayores niveles en raíces inoculadas en comparación con raíces inoculadas con agua como control. Consistente con los resultados reportados en plantas *wild type* (Crespi *et al.*, 1994, Lohar *et al.*, 2006, Moreau *et al.*, 2011), se observó una acumulación de orden similar de los transcritos de estas nodulinas tempranas en las raíces 35S-FLAG-RPL18 luego de la inoculación con *S. meliloti* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Acumulación relativa de mRNAs de marcadores tempranos de nodulación en raíces transgénicas 35S:FLAG-RPL18 y raíces de plantas *wild type*.

Identificador <sup>a</sup>	Descripción del gen	Tiempo (hpi)	Niveles relativos a raíces sin inocular	
			<u>Raíces 35S:FLAG-RPL18</u> <sup>b</sup>	<u>Raíces <i>wild type</i></u> <sup>c</sup>
X80264	<i>ENOD40</i>	12	1.31 ± 0.10	1.3
		24	1.44 ± 0.20	1.3
		48	2.30 ± 0.68	2.4
AJ297721.1	<i>ENOD11</i>	48	146.76 ± 20.08	224.2
X68032.1	<i>ENOD12</i>	48	2.82 ± 0.08	3.7
Medtr8g106150.1	<i>CRE1</i>	48	1.20 ± 0.19	1.21

<sup>a</sup> Basado en la versión 3.5 del genoma de *M. truncatula* o el número de acceso del GenBank.

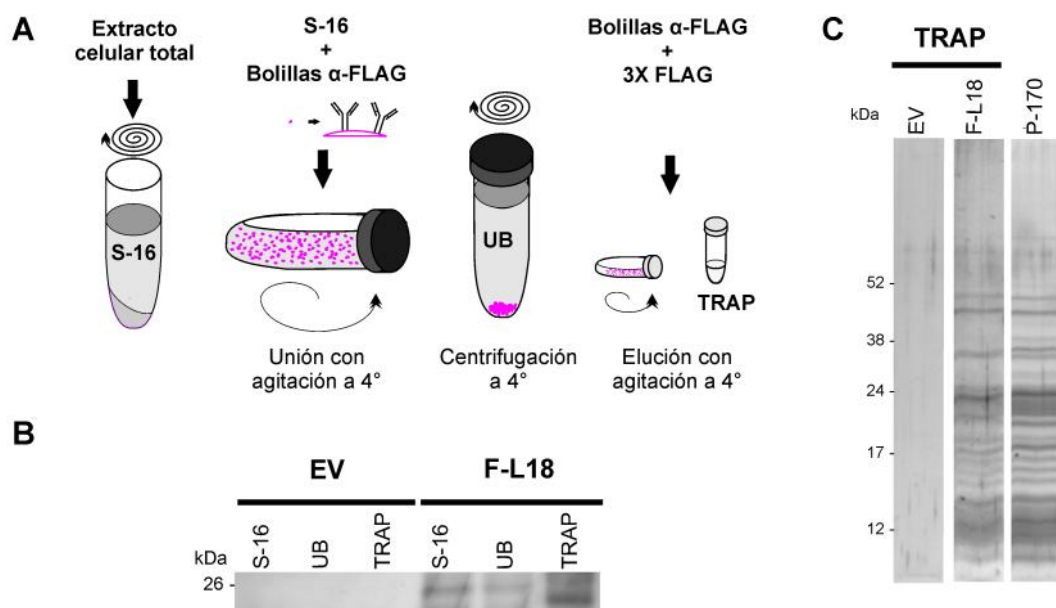
<sup>b</sup> Se midió el nivel del transcrito indicado por RT-qPCR en plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021 o con agua como control. Se muestra el cociente entre ambos valores ± desviación estándar. Los niveles de transcritos de cada muestra fueron normalizados por los niveles de *HIS3L*.

<sup>c</sup> Datos de niveles de transcritos cuantificados por microarreglos (Lohar *et al.*, 2006). El valor de *ENOD11* corresponde a datos de RT-qPCR (Moreau *et al.*, 2011).

Los resultados descriptos hasta aquí muestran que la proteína RPL18 de *M. truncatula* fusionada a FLAG se incorpora eficientemente en los ribosomas involucrados en la traducción y que la expresión de la misma no genera cambios en el fenotipo de desarrollo y nodulación ni en las respuestas moleculares que se generan por la infección con rizobios.

Una vez obtenidas las plantas compuestas que expresan la proteína de fusión FLAG-RPL18 se procedió a ensayar la técnica de TRAP en *M. truncatula*. Los complejos polisómicos fueron inmunopurificados a partir de extractos de raíces de *M. truncatula* siguiendo la metodología descrita para plántulas de *Arabidopsis*. La extracción inicial se realizó en el *buffer* de extracción de polisomas (PEB), que contiene pH alcalino para evitar que las vacuolas ácidas presentes disminuyan el pH del extracto, generando las condiciones óptimas para la acción de RNAsas. A su vez, PEB contiene una alta fuerza iónica para prevenir la degradación de polisomas y disminuir la susceptibilidad a las RNAsas exógenas, detergentes para permitir la liberación de polisomas unidos a membranas y citoesqueleto e inhibidores de la elongación de la síntesis proteica. Además, el *buffer* contiene EGTA para prevenir la degradación de RNA. Luego de una homogenización inicial de los extractos obtenidos se realizó un paso de centrifugación para eliminar los restos celulares (Figura 15A). Con el sobrenadante obtenido, que es considerado el extracto total, se realizó la incubación con

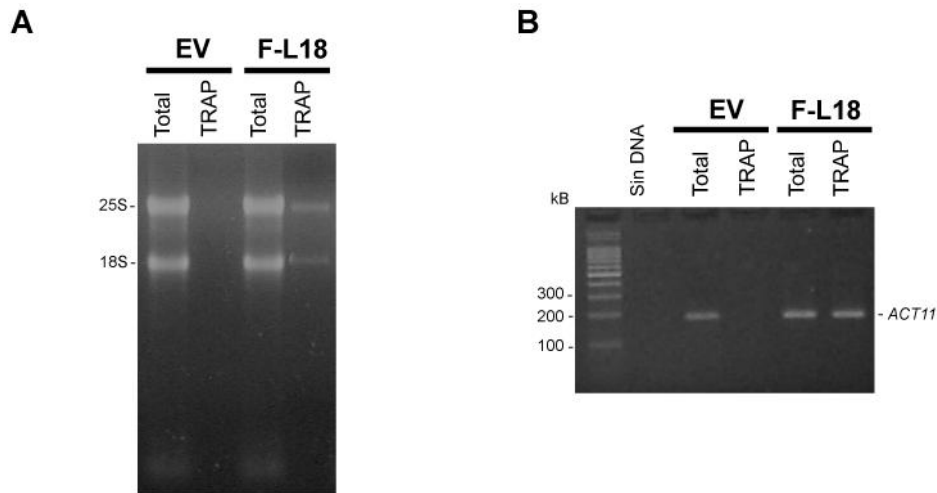
el anticuerpo anti-FLAG conjugado a agarosa para permitir la unión a este péptido. Luego de la incubación se conservó una alícuota del extracto no unido (UB) y se realizaron lavados con *buffer* PEB libre de detergentes. Finalmente, se procedió a la elución por competencia y desplazamiento de la unión del anticuerpo con *buffer* de lavado conteniendo el péptido 3X FLAG para obtener la fracción denominada TRAP (Figura 15A). Ensayos de *Western Blot* permitieron detectar la presencia de la proteína FLAG-RPL18 en las fracción TRAP, en el extracto total (S-16) y en menor medida la fracción UB (Figura 15B). Las muestras S-16 y UB fueron precipitadas con 2 volúmenes de etanol y resuspendidas en *buffer* de carga de proteínas. Por su parte la muestra TRAP fue extraída directamente en *buffer* de carga sobre el *buffer* de resuspensión conteniendo PEB libre de detergentes. La diferencia en la migración de la señal detectada en la muestra TRAP se debe posiblemente a la diferencia en la composición del *buffer* de esa fracción. Otros polipéptidos presentes en la fracción TRAP mostraron una movilidad electroforética y una intensidad similares a los complejos obtenidos mediante purificación convencional por ultracentrifugación en colchón de sacarosa (Figura 15C). Algunos polipéptidos detectados exclusivamente en la fracción del precipitado ribosomal podrían corresponder a componentes de otros complejos que co-purifican con los ribosomas durante la ultracentrifugación, tales como pseudo-polisomas, cuerpos de procesamiento o gránulos de almacenamiento (Halbeisen *et al.*, 2009). La especificidad de la inmunopurificación fue confirmada por la limitada detección de péptidos en la fracción TRAP obtenida a partir de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (Figura 15C).



**Figura 15. Purificación por afinidad de ribosomas en traducción activa (TRAP) en *M. truncatula*.** **A.** Etapas de la técnica de TRAP. La purificación se realiza a partir de raíces expresando el epítipo FLAG-RPL18 mediante homogeneización en *buffer* de extracción de polisomas (PEB). El extracto celular total es centrifugado a 16.000 xg para obtener el sobrenadante S-16. Se realiza la unión de la proteína de fusión a los anticuerpos anti FLAG ( $\alpha$ -FLAG). Se colecta la fracción no unida (UB), luego de 4 lavados se realiza la elución con el péptido 3X FLAG, y se colecta la fracción TRAP. **B.** Las fracciones total (S-16), UB y de TRAP a partir de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (EV) o 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) fueron analizadas por *Western blot* utilizando un anticuerpo dirigido contra el péptido FLAG ( $\alpha$ -FLAG). Las muestras corresponden a aproximadamente un 1 % para S-16 y UB, y un 10 % para TRAP equivalentes al volumen total utilizado. La migración del marcador de masa molecular se indica a la izquierda. **C.** Las proteínas purificadas mediante TRAP, tanto de raíces transformadas con el vector vacío (EV) o con 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) y las proteínas ribosomales preparadas por el procedimiento convencional de ultracentrifugación (P-170) fueron separadas en un SDS-PAGE 15 % (p/v) y visualizadas mediante tinción con nitrato de plata. El volumen de las fracciones TRAP EV y F-L18 sembrado fue el mismo. Los asteriscos a la derecha indican bandas diferenciales que se encuentran presentes en la fracción P-170 y no en las de TRAP. La migración del marcador de masa molecular se indica a la izquierda en kDa.

A partir del extracto total y de la fracción obtenida por TRAP se realizaron extracciones de RNA. El análisis mediante geles de agarosa permitió detectar la presencia de los RNA ribosomales (rRNA) 25S y 18S en las muestras de extractos totales, y de TRAP de tejido que expresa FLAG-RPL18, pero no en las muestras TRAP de tejido transformado con el vector vacío 35S:HF (Figura 16A). El rendimiento del RNA obtenido se estimó en 400-500 ng por ml de tejido pulverizado en las muestras TRAP y resultó comparable al reportado previamente para raíces de plántulas de *Arabidopsis* mediante la misma técnica (Mustroph *et al.*, 2009a). Para evaluar la presencia de mRNAs en las muestras TRAP se realizó una reacción de RT-PCR semicuantitativa del transcripto *ACTINA11*, el cuál se encuentra presente en alta abundancia (Figura 16B). El uso de *primers* que se encuentran en dos exones contiguos del gen permitió establecer tanto la presencia de mRNA, como la ausencia de DNA genómico contaminante. Se obtuvo un fragmento del tamaño esperado para la

amplificación del cDNA en las muestras correspondientes a RNA total de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF o con 35S:FLAG-RPL18 y en la muestra TRAP de raíces que expresan FLAG-RPL18, pero no fue detectado en la muestra TRAP de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF. Estos datos confirmaron la presencia de mRNAs en la muestra de TRAP de raíces 35S:FLAG-RPL18.

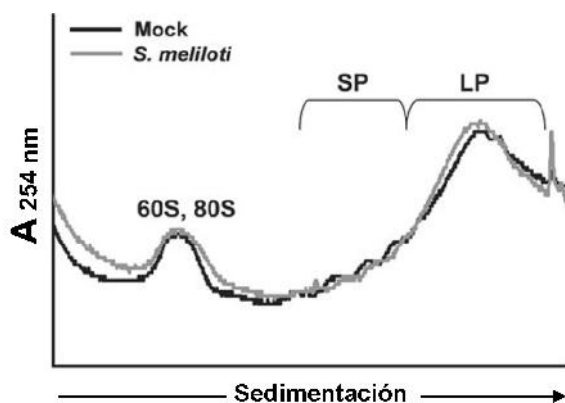


**Figura 16. Análisis de la presencia de rRNA y mRNA en las fracciones obtenidas mediante TRAP.** A. El RNA total o purificado mediante TRAP a partir de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (EV) o 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) fue separado por electroforesis en gel de agarosa 1,2 % (p/v). La migración de los rRNAs 25S y 18S se indican a la izquierda. B. El RNA total y TRAP de raíces transformadas con EV o F-L18 fueron utilizadas en una reacción de RT-PCR semicuantitativa con *primers* correspondientes al transcripto de *ACT11*. La primera calle es el control de amplificación sin DNA. El marcador de peso molecular se indica a la izquierda y el tamaño esperado para la amplificación de *ACT11* a partir de cDNA a la derecha.

En base a los resultados presentados en este capítulo, fue posible concluir que la expresión de FLAG-RPL18 en *M. truncatula* permite la purificación por afinidad de ribosomas y polisomas, así como los mRNAs asociados a estos complejos RNPs sin afectar el desarrollo de la planta, la formación de nódulos o la inducción de marcadores tempranos de la nodulación. Este desarrollo provee una herramienta valiosa para analizar la regulación traduccional durante procesos biológicos que involucran la raíz de plantas leguminosas, particularmente de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

## Capítulo II. Análisis de la regulación traduccional de genes involucrados en la simbiosis mediante TRAP

Los estudios de expresión génica a escala genómica han caracterizado los niveles estacionarios de mRNAs para diversas etapas del proceso de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *M. truncatula* y *S. meliloti* (Lohar *et al.*, 2006, Benedito *et al.*, 2008, Maunoury *et al.*, 2010, Moreau *et al.*, 2011). Sin embargo, estos datos no distinguen entre aquellos mRNAs que están siendo traducidos, almacenados en complejos RNPs o enviados a degradación. En este capítulo se planteó como objetivo analizar la contribución de la traducción de mRNAs a los cambios en la expresión génica durante la simbiosis. Para esto se evaluaron los cambios en los niveles de mRNAs asociados a los complejos traduccionalmente activos durante la simbiosis fijadora de nitrógeno utilizando la técnica de TRAP. Tal como se mencionó en la sección Introducción, estudios previos han demostrado que la exposición de las plantas a ciertas condiciones ambientales puede imponer una inhibición global de la traducción de mRNAs (Bailey-Serres *et al.*, 2009). Es por ello que, previo a abordar los estudios de TRAP sobre transcritos individuales, se evaluó si la infección con *S. meliloti* afectaba los niveles globales de transcritos asociados a los ribosomas y polisomas. Se obtuvieron extractos totales de raíces *wild type* de *M. truncatula* inoculadas por 48 horas con *S. meliloti* o con agua como control (Mock). Dichos extractos fueron ultracentrifugados en un colchón de sacarosa 1,7 M para obtener los precipitados ribosomales, los cuales fueron posteriormente fraccionados por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa 20-60 % (p/v). Los perfiles de absorbancia obtenidos a 254 nm se muestran en la Figura 17.



**Figura 17. Efecto de la inoculación con *S. meliloti* sobre el perfil de polisomas.** Extractos totales de raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control (Mock) fueron fraccionados por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa 20-60% (p/v). Para cada una de las fracciones se registró el perfil de absorbancia a 254 nm (A<sub>254</sub>). Se indican las posiciones de la subunidad ribosomal 60S, monosomas (80S), polisomas pequeños (SP por *small polysomes*, entre 2 y 5 ribosomas por transcritos) y polisomas grandes (LP por *large polysomes*, más de 5 ribosomas por transcritos).

A partir de los datos de los perfiles de polisomas, se llevó a cabo un análisis cuantitativo del RNA presente en las fracciones no polisómicas (NP), de polisomas pequeños (SP, de 2 a 5 ribosomas por transcripto) y de polisomas de mayor tamaño (LP, más de 5 ribosomas). Este análisis reveló que un 78 % del RNA se encuentra asociado a los polisomas (fracciones SP y LP) de raíces de plantas *wild type* inoculadas con agua. Este valor resultó cercano al reportado previamente para plántulas de *Arabidopsis* (Branco-Price *et al.*, 2008). La inoculación de las raíces con *S. meliloti* no produjo cambios significativos en el porcentaje de RNA presente en las fracciones NP, SP y LP respecto a las mismas fracciones de las raíces inoculadas con agua (Tabla 2). Este resultado indica que la inoculación con *S. meliloti* no afecta significativamente el perfil de polisomas de las raíces de *M. truncatula*, al menos al tiempo evaluado en este estudio (48 horas luego de la inoculación con rizobio).

**Tabla 2. Efecto de la inoculación con *S. meliloti* sobre la asociación a polisomas.**

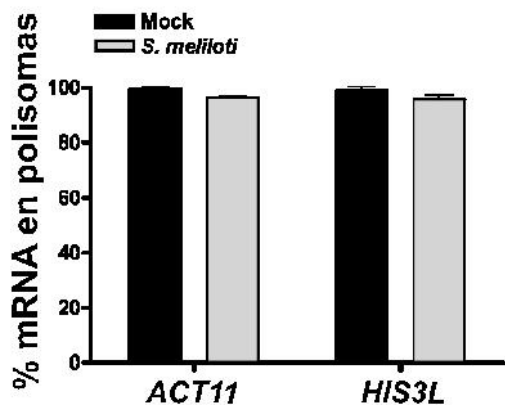
	NP	SP	LP
Mock 48 hpi	21.7 ± 0.9	20.8 ± 0.2	57.5 ± 0.8
<i>S. meliloti</i> 48 hpi	21.9 ± 0.4	20.4 ± 0.2	57.7 ± 1.0

Se utilizaron raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control (Mock) luego de 48 horas. El porcentaje de RNA asociado a cada fracción fue cuantificado por integración del área bajo la curva para las fracciones conteniendo complejos no polisómicos (NP), polisomas pequeños (SP) y polisomas de mayor tamaño (LP) dividida por el área total (NP+SP+LP) y multiplicado por 100. Se presenta la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes. Las diferencias encontradas entre los valores de raíces inoculadas no resultaron significativas en un *test* t-Student no apareado de dos colas.

El análisis de los resultados hasta aquí permitiría descartar un efecto global de la infección con *S. meliloti* sobre el estado traduccional de los mRNAs en las raíces de *M. truncatula*. Sin embargo, es posible que los transcriptos individuales involucrados en la interacción cambien su asociación a los polisomas. Para poder cuantificar los niveles de los transcriptos de interés fue necesario establecer una forma de normalizar los datos. Con este fin se evaluaron los cambios en la asociación a polisomas de *ACTINA11* (*ACT11*) e *HISTONA3L* (*HIS3L*), dos transcriptos usados previamente como genes de referencia para la normalización de datos de RT-qPCR (Ariel *et al.*, 2010). Se cuantificaron los niveles de los transcriptos de estos genes en las fracciones de polisomas (SP+LP) y no polisomas (NP) mediante RT-qPCR, y se normalizaron por la cantidad de RNA presente en cada fracción. Ambos mRNAs mostraron porcentajes de asociación a polisomas superiores al 96 % en las raíces no inoculadas, los cuales no se modificaron significativamente en las raíces inoculadas con *S. meliloti* (Figura 18). Este

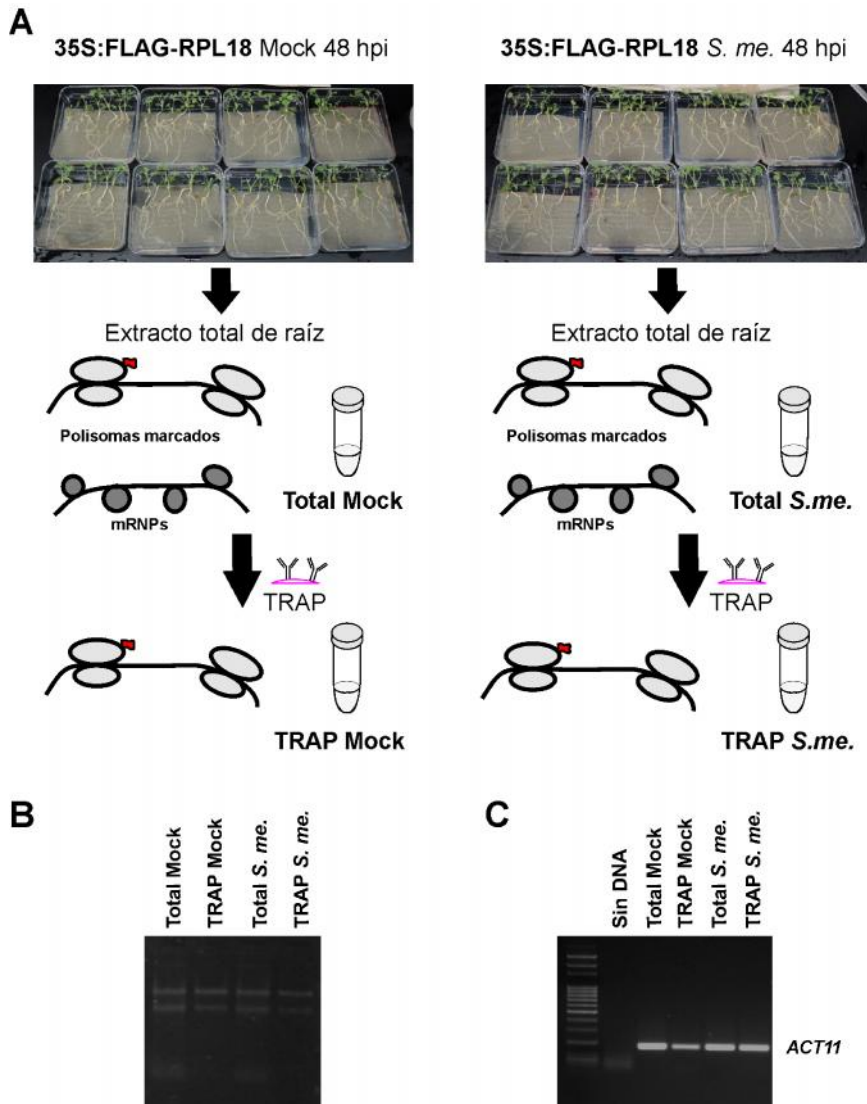


resultado nos permitió concluir que ambos transcritos, *ACT11* y *HISL3*, no varían su asociación a polisomas en respuesta a la inoculación con el rizobio lo que permite su uso como genes de referencia en muestras de polisomas.



**Figura 18. Efecto de la inoculación con *S. meliloti* sobre la asociación de *Actina11* (*ACT11*) e *Histona3L* (*HIS3L*) a polisomas.** La abundancia de los transcritos fue cuantificada por RT-qPCR en las fracciones no polisómicas (NP) y polisómicas (P) de raíces de *M. truncatula* inoculadas por 48 horas con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras). Los valores fueron normalizados por la cantidad de RNA presente en cada muestra para tomar en cuenta la diferencia de rendimiento de RNA. Se expresa el porcentaje de asociación a polisomas determinado dividiendo las abundancias normalizadas obtenidas para la fracción P por la suma de las fracciones NP y P, la cual equivale al nivel total de transcripto. Las barras indican la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Los resultados son representativos de 2 réplicas biológicas.

Para investigar si la asociación a polisomas de mRNAs específicos se ve modificada en las raíces de *M. truncatula* como consecuencia de la inoculación con *S. meliloti* se purificaron los complejos de polisomas de plantas inoculadas con el rizobio o con agua como control mediante el método TRAP (Figura 19A). A partir de estas muestras se realizaron extracciones de RNA. Los RNAs obtenidos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa, observándose las bandas correspondientes al RNA ribosomal en cada uno de los tratamientos (Figura 19B). La presencia de mRNAs en estas muestras se verificó mediante RT-PCR semicuantitativa del gen *ACT11* (Figura 19C).



**Figura 19. Purificación de polisomas mediante TRAP en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.** **A.** Plantas compuestas de *M. truncatula* transformadas con la construcción 35S:FLAG-RPL18 fueron inoculadas con *S. meliloti* 1021 (*S.me.*) o con agua como control (Mock) por 48 horas. Se colectaron las muestras de extractos totales de raíz (Total) conteniendo polisomas que incorporaron la proteína FLAG-RPL18 (Polisomas marcados) y otros complejos ribonucleoproteicos (mRNPs). La proteína FLAG-RPL18 se indica en rojo en la representación de la subunidad mayor del ribosoma. Utilizando la técnica de TRAP se purificaron los polisomas marcados para obtener las muestras TRAP. **B.** Se realizó una extracción de RNA a partir de las muestras obtenidas. Los RNA fueron separados en un gel de agarosa 1,2 % y las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV. **C.** Las muestras de RNA fueron utilizadas en una reacción de RT-PCR semicuantitativa con *primers* correspondientes al transcripto de *ACTINA11* (*ACT11*). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa 1,5 % (p/v) y se visualizaron como en **B**. Se incluyó un marcador de peso molecular y un control de amplificación sin DNA. Se indica el tamaño esperado para la amplificación de *ACT11* a partir de cDNA a la derecha.

A partir de este material se cuantificaron mediante RT-qPCR los niveles de quince transcriptos individuales involucrados en las vías de señalización activadas durante la nodulación, tanto en las muestras de RNA total como en las de RNA de polisomas purificados por TRAP. Para evaluar cuantitativamente la regulación traduccional independientemente de los cambios a nivel estacionario de mRNA se

calculó la relación entre la variación a nivel de RNA asociado a polisomas y la variación a nivel de RNA total para cada transcripto en respuesta a la inoculación con rizobio. Los transcriptos se clasificaron en tres grupos en base al valor de la relación de variación en RNA polisómico/variación en RNA total. El grupo A incluye los mRNAs con un valor igual o mayor a 2, el grupo B contiene mRNAs con un valor entre 0,5 y 2 y el grupo C los mRNAs con un valor menor a 0,5. Los resultados obtenidos para los niveles de RNA total y asociados a polisomas para cada uno de estos genes en plantas inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control se muestran en la Figura 20. El grupo A, compuesto por transcriptos que muestran evidencias de regulación positiva a nivel traduccional, incluye los transcriptos que codifican los receptores de tipo quinasa (RLKs) NFP, DMI2 y CRE1, así como también los factores de transcripción de la familia GRAS, NSP1 y NSP2 y de la familia NF-Y, NF-YA1 y NF-YC1 (Figura 20A). Es interesante destacar que los transcriptos correspondientes a los factores de transcripción NSP1 y NSP2, los cuales forman parte un complejo heterodimérico (Hirsch *et al.*, 2009), mostraron relaciones de la variación en RNA polisómico/variación en RNA total en respuesta al rizobio muy similares (3,8 y 4,0, respectivamente). Asimismo, miembros que son parte de un complejo transcripcional heterotrimérico (Laloum *et al.*, 2013), como NF-YA1 y NF-YC1, mostraron relaciones de 2,9 y 2,6 respectivamente. Estos resultados sugieren una regulación traduccional coordinada para factores de transcripción que actúan en forma conjunta y cumplen un rol clave en la simbiosis. El grupo B incluye genes que no muestran evidencia de regulación a nivel traduccional, tales como los que codifican los factores de transcripción NIN y ERN1 y la nodulina ENOD40. Estos transcriptos presentaron variaciones similares en las muestras de RNA total y polisomal (Figura 20B). Además el grupo B incluye a los mRNAs que codifican el receptor LYK3, la E3 ubiquitin ligasa LIN, una quinasa dependiente de calcio y calmodulina DMI3 y su proteína asociada IPD3. Estos transcriptos no mostraron cambios significativos ya sea a nivel de RNA total o de polisomas (Figura 20B). El grupo C tiene como único miembro a *DMII*, gen que mostró un aumento en los niveles estacionarios de mRNA, pero una disminución de la asociación a polisomas en respuesta a la inoculación (Figura 20C).

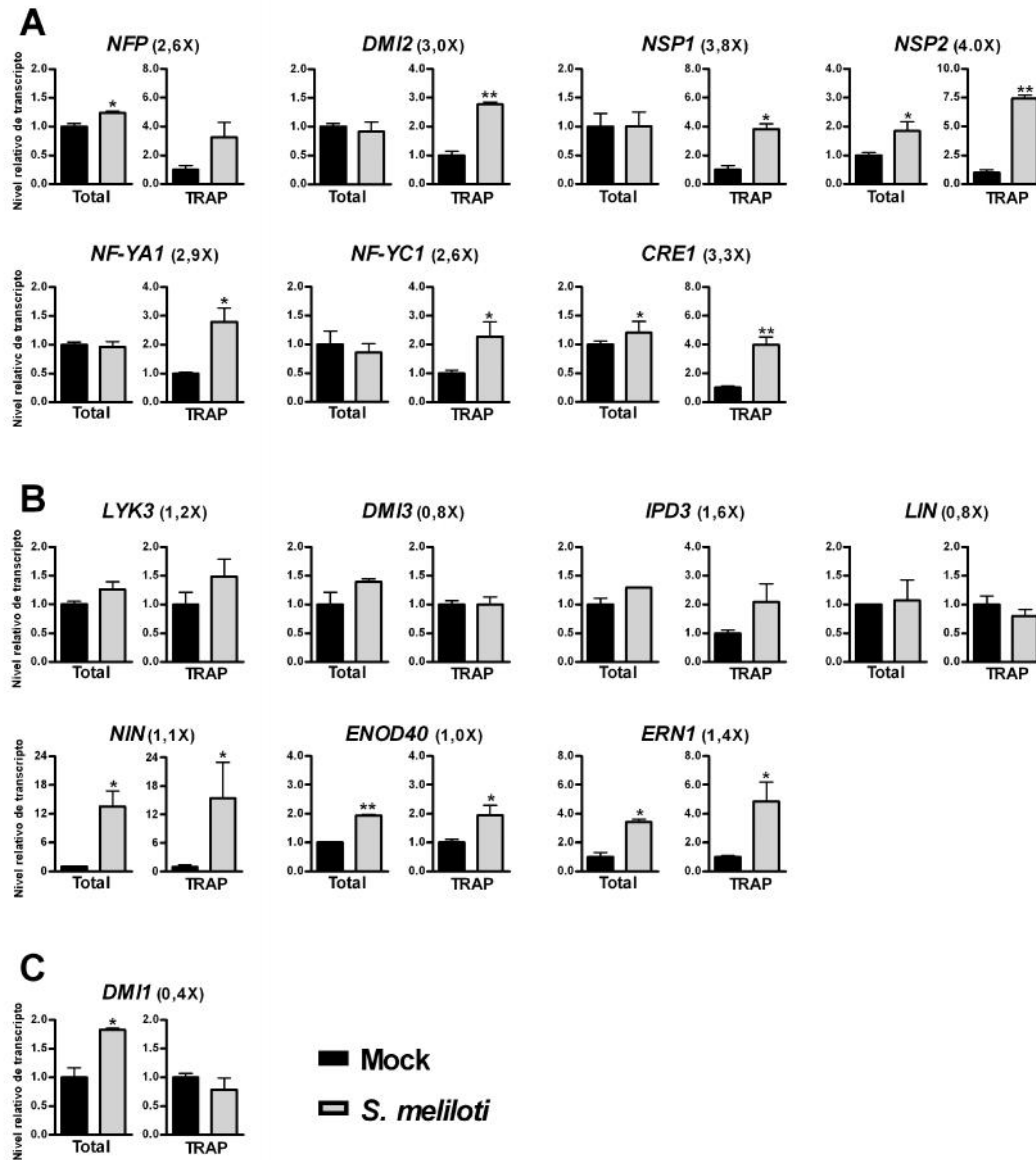
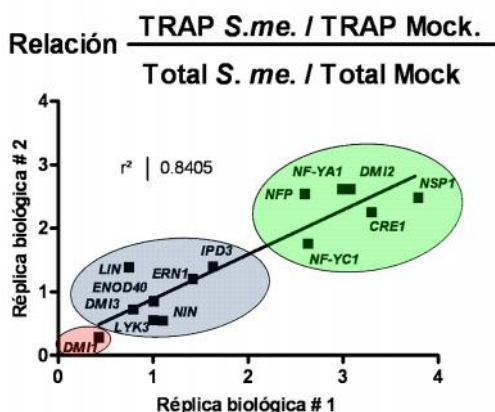


Figura 20. Asociación selectiva de transcritos a polisomas en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Niveles de transcritos medidos por RT-qPCR en muestras de RNA total o de polisomas purificados mediante TRAP. Se utilizaron raíces de *M. truncatula* que expresan FLAG-RPL18, 48 horas luego de la inoculación con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras). Los transcritos fueron clasificados en tres grupos en base a la relación calculada entre la variación en RNA polisómico TRAP y la variación en RNA Total en respuesta a la inoculación, valor que se presenta entre paréntesis luego del nombre del transcrito: **A**, genes regulados positivamente a nivel traduccional; **B** genes en los que existe una correlación entre su regulación transcripcional y traduccional; y **C**, un gen regulado negativamente a nivel traduccional. Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcrito *HIS3L* y están expresados relativos a la condición control. Los asteriscos indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras Mock en un *t*-test no apareado de dos colas con  $0,01 < P < 0,05$  (\*) y  $0,001 < P < 0,01$  (\*\*).

Para verificar la reproducibilidad de la técnica se analizaron los datos de 2 réplicas biológicas (Figura 21). Se obtuvo una buena correlación para la relación entre la variación en RNA polisómico y la variación en RNA total en respuesta a la infección por rizobio ( $r^2=0.84$ ) entre ambas réplicas.



**Figura 21. Reproducibilidad del efecto de la inoculación con rizobios en la relación entre los niveles de mRNAs asociados a polisomas y total en dos réplicas biológicas.** Se realizó un diagrama de dispersión que muestra la relación entre la variación del nivel de un transcripto individual en RNA asociado a polisomas (TRAP) y la variación en RNA total en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* para dos réplicas biológicas. Los datos se obtuvieron mediante RT-qPCR y la normalización se realizó por los niveles de *HIS3L*. Se indica el coeficiente de correlación de la regresión lineal ( $r^2$ ). En verde se engloban los genes regulados positivamente a nivel traduccional; en celeste los que no presentan regulación a nivel traduccional y en rosa los regulados negativamente a nivel traduccional.

El análisis de los resultados sugiere que el reclutamiento diferencial de mRNAs a los polisomas contribuye significativamente a la regulación de genes que son esenciales para la formación del nódulo, la infección bacteriana o ambos procesos. Para validar los resultados obtenidos mediante TRAP, se realizaron extracciones de RNA de polisomas purificados mediante la metodología convencional de ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa. Las fracciones conteniendo 2 o más ribosomas fueron colectadas juntas para obtener la fracción polisómica (indicada en la Figura 17 como SP y LP) de raíces de plantas inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control. A partir de estas fracciones se realizó la extracción de RNA total y se determinaron los niveles de los 15 transcriptos seleccionados (Figura 22). Los cambios obtenidos para los niveles de mRNAs en las muestras de RNA polisómico purificado convencionalmente en respuesta a *S. meliloti* fueron consistentes con los obtenidos mediante TRAP para 13 de los 15 transcriptos analizados. Los transcriptos restantes fueron *NFP* y *NF-YC1*, cuyos niveles se incrementaron en respuesta a la infección en los polisomas aislados por TRAP, pero no en los purificados convencionalmente. Las discrepancias en la abundancia de estos transcriptos podrían ser causadas por la contaminación de los polisomas purificados convencionalmente con otros complejos ribonucleoproteicos de alto peso molecular, los cuales son excluidos en los inmunopurificados por TRAP. Otra posible explicación está relacionada con el procedimiento experimental, en el cual la alta fuerza de centrifugación usada para el fraccionamiento en gradientes de sacarosa podría causar la disociación de ciertos mRNAs de los complejos polisómicos o bien la degradación parcial de dichos mRNAs.

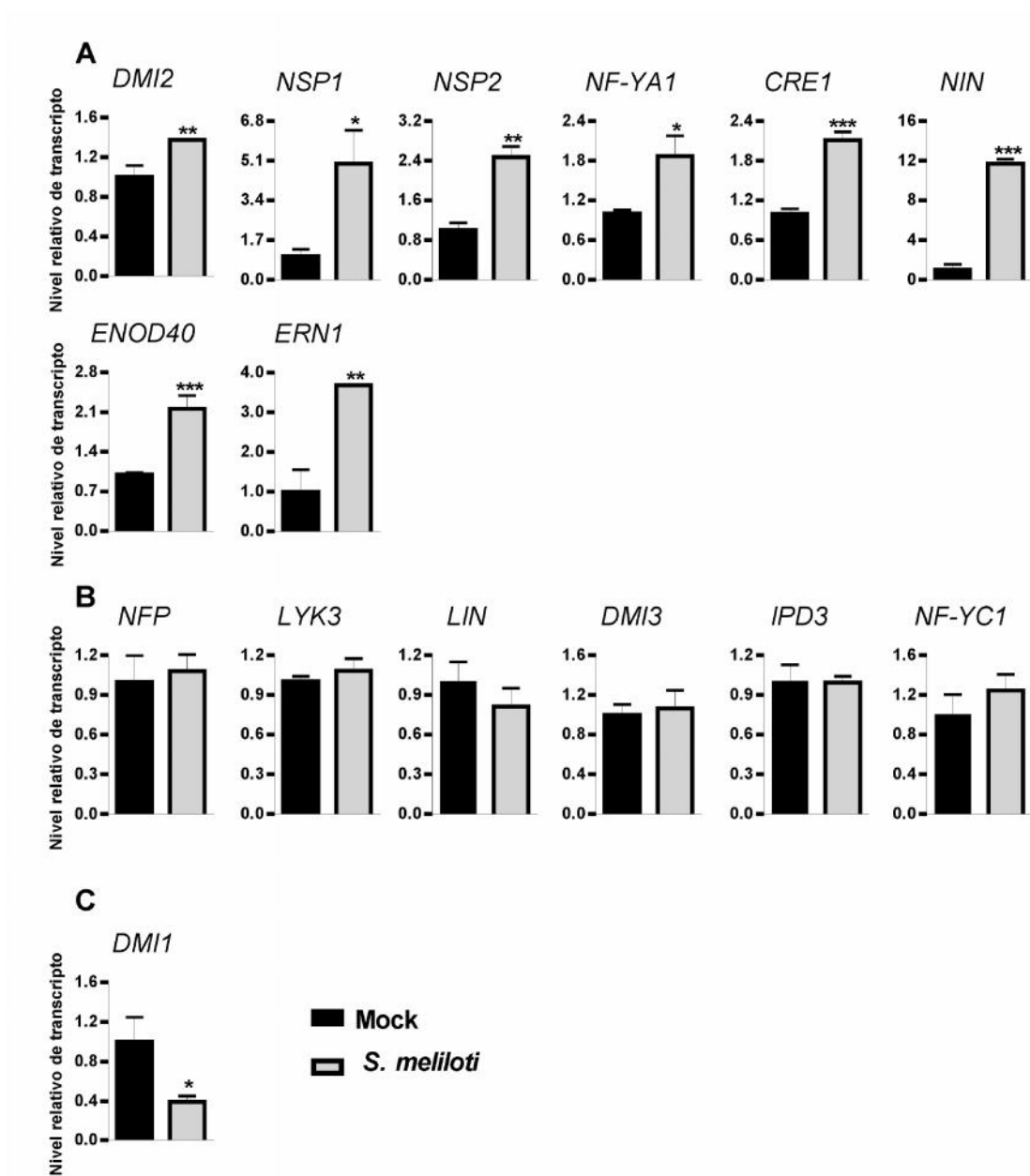


Figura 22. Asociación de mRNAs a polisomas purificados por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Los niveles de los mRNAs seleccionados fueron analizados por RT-qPCR en las fracciones de polisomas (2 o más ribosomas por mRNA) de raíces *wild type* inoculadas con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras) por 48 horas. Los transcritos fueron clasificados como: **A**, regulados positivamente, **B**, no regulados y **C**, regulados negativamente basándose en el cambio de la fracción polisomal en respuesta a la inoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcripto *HIS3L* y están expresados relativos a la condición control. Los asteriscos indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras control en un *test* t-Student no apareado de dos colas, con  $0,01 < P < 0,05$  (\*);  $0,001 < P < 0,01$  (\*\*) y  $0,001 > P$  (\*\*\*).

El análisis de los resultados hasta aquí presentados permitió concluir que no se producen cambios globales a nivel del estado traduccional general evaluado mediante el análisis de los perfiles de polisomas. Sin embargo, la evaluación del comportamiento transcritos individuales evidenció que existirían cambios significativos en el estado

traduccional en respuesta a la infección con rizobio para genes que cumplen funciones claves en el desarrollo de la interacción simbiótica.

El análisis de los mRNAs asociados a polisomas en *Arabidopsis* ha mostrado que el inicio de la traducción se ve afectado por las características de cada mRNA tales como la longitud, la estructura secundaria y el contenido CG de las regiones 5' UTR y 3' UTR, así como la longitud del marco abierto de lectura (Kawaguchi and Bailey-Serres 2005). En base a estos antecedentes se decidió evaluar los parámetros mencionados en los transcritos de los grupos A, B y C, los cuales mostraron distintos comportamientos traduccionales en respuesta a la inoculación con el rizobio (ver Figura 20). Para analizar estas características se realizó una búsqueda en las bases de datos de secuencias genómicas ([www.medicagohapmap.org](http://www.medicagohapmap.org)) y de secuencias expresadas (ESTs; <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) para obtener las secuencias de las regiones UTR (Tabla 3). Cabe mencionar que para los genes *NSP2*, *NIN*, *LIN* y *DMII* no fue posible obtener información de las regiones 5' y 3' UTR en las bases de datos consultadas. Por otro lado para los genes *NIN* y *DMI3* no fue posible obtener información de sus regiones 5' UTR y 3' UTR, respectivamente

A partir de las secuencias obtenidas se predijo la energía libre ( $\Delta G$ ) de las estructuras secundarias formadas mediante MFOLD (Zuker 2003) y se calculó el contenido de CG. Las longitudes promedio de las regiones 5'UTR y 3'UTR fueron de 128 pb y 323 pb, respectivamente con un porcentaje CG promedio de 35,2 y 32,6 (Tabla 3). Los valores obtenidos para la longitud y el contenido CG del 5' UTR, así como también el contenido CG y  $\Delta G$  del 3'UTR resultaron similares a los reportados previamente en *Arabidopsis* (Kawaguchi and Bailey-Serres 2005). Los genes del grupo A no presentaron características que los distingan del resto en cuanto a los parámetros de longitud, contenido CG y energía libre de las estructuras secundarias de las regiones UTR.

**Tabla 3.** Características de los transcritos involucrados en la señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Descripción del gen <sup>a</sup>	Identificador del gen <sup>b</sup>	Longitud 5' UTR (pb) <sup>c</sup>	G 5' UTR (kCal/mol) <sup>d</sup>	Contenido CG 5' UTR (%)	Longitud CDS (pb) <sup>c</sup>	Longitud 3' UTR (pb) <sup>c</sup>	G 3' UTR (kCal/mol) <sup>d</sup>	Contenido CG 3' UTR (%)
<i>NSP1</i>	Medtr8g020840.1	121	-4.8	30.6	1665	213	-42.6	33.3
<i>NSP2</i>	Medtr3g072710.1	ND	ND	ND	1527	ND	ND	ND
<i>NF-YAI</i>	Medtr1g056530.1	88	-18.0	32.9	999	510	-124.6	36.6
<i>NF-YCI</i>	Medtr7g113680.1	88	-14.5	42.0	782	272	-62.4	36.4
<i>CRE1</i>	Medtr8g106150.1	165	-39.9	40.6	3090	483	-105.9	30.4
<i>NFP</i>	Medtr5g019040.1	35	1.9	40.0	1788	213	-38.8	29.1
<i>DMI2</i>	Medtr5g030920.1	370	-48.1	31.9	2775	418	-89.8	32.3
<i>IPD3</i>	Medtr5g026850.1	327	-62.8	30.3	1542	313	-51.5	31.5
<i>ERN1</i>	Medtr7g085810.1	75	-2.4	30.7	807	ND	ND	ND
<i>LYK3</i>	Medtr5g086130.1	28	1.0	35.7	1863	218	-41.7	31.2
<i>ENOD40</i>	X80264	94	-11.7	42.1	48	542	-143.1	35.7
<i>NIN</i>	Medtr5g099060.1	ND	ND	ND	2802	259	-43.4	32.8
<i>LIN</i>	Medtr1g090320.1	ND	ND	ND	4467	ND	ND	ND
<i>DMI3</i>	Medtr8g043970.1	20	4.3	30.0	1572	ND	ND	ND
<i>DMI1</i>	Medtr2g005870.1	ND	ND	ND	2649	ND	ND	ND
<b>Promedio</b>		128.3	-17,7	35.2	1892	322.9	-68.9	32.6
Genes de Arabidopsis <sup>e</sup>	(Kawaguchi and Bailey-Serres 2005)	124.7	-35	39	1268.2	247.8	-69	32

<sup>a</sup> En verde se indican los genes regulados positivamente a nivel traduccional, en celeste aquellos que muestran correlación entre su regulación transcripcional y traduccional, y en rosa el transcripto que es regulado negativamente a nivel traduccional.

<sup>b</sup> Los identificadores de cada gen son los que se indican en el genoma de *M. truncatula*, y para *ENOD40* corresponde al número de acceso al GenBank.

<sup>c</sup> Los datos corresponden a las secuencias obtenidas del genoma de *Medicago truncatula* Mt3.5 v4 de [www.medicagohapmap.org](http://www.medicagohapmap.org) y de la base de datos de secuencias expresadas ESTs del DFCI <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>. ND corresponde a datos no disponibles en las bases de datos utilizadas.

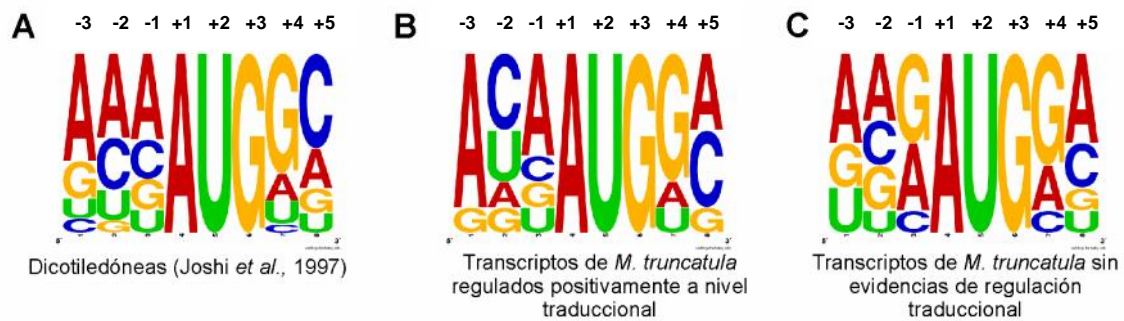
<sup>d</sup> El G fue calculado mediante la predicción de estructura del programa MFOLD <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>.

<sup>e</sup> Los datos de Arabidopsis corresponden al total de los genes analizados por Kawaguchi and Bailey-Serres 2005.

Por otro lado, la secuencia flanqueante al codón de inicio AUG puede afectar la eficiencia de la iniciación de la traducción, modificando así la asociación de los transcritos a polisomas. Se analizó el contexto de inicio de los transcritos involucrados en la señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno. En plantas dicotiledóneas los nucleótidos más frecuentes son A en la posición -3 y G en la posición +4 (Joshi *et al.*, 1997). Esta característica se conserva para los mRNAs analizados independientemente de su regulación traduccional en respuesta al rizobio (Figura 23). Asimismo, los mRNAs seleccionados en este trabajo presentan, a diferencia del consenso para dicotiledóneas, mayor porcentaje de A en la posición +5. El consenso para los genes del grupo A presenta a su vez mayor proporción de C y U en la posición -



2 con respecto al consenso para dicotiledóneas (Figura 23A y B). Por otra parte, los genes de grupo B analizados presentan al igual que el consenso mayor proporción de A en la posición -2, pero se diferencian en la posición -1, donde G es el nucleótido mayoritario (Figura 23A y C). A partir del análisis se encontraron diferencias en las posiciones -2 y -1 en los contextos de inicio de los genes del grupo A con respecto al resto de los genes cuantificados. Esta característica diferencial podría cumplir un rol en la regulación traduccional obtenida para este grupo. Sin embargo, la validación de estos resultados requiere de la inclusión de un mayor número de genes.



**Figura 23. Frecuencia de bases en el contexto del codón AUG de los grupos de transcritos con diferente regulación traduccional.** **A.** Representación del contexto de inicio de la traducción de plantas dicotiledóneas según los datos de reportados por (Joshi *et al.*, 1997). **B.** Representación del contexto de inicio de la traducción en los transcritos de *M. truncatula* regulados positivamente a nivel traduccional en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* (grupo A; *NSP1*, *NSP2*, *NF-YA1*, *NF-YC1*, *CRE1*, *DMI2* y *NFP*) **C.** Representación del contexto de inicio de la traducción en los transcritos de *M. truncatula* sin evidencias de regulación traduccional en respuesta al rizobio (grupo B; *LYK3*, *DMI3*, *IPD3*, *LIN*, *NIN*, *ENOD40*, *ERN1*). El tamaño de cada nucleótido es proporcional a su frecuencia en cada posición. Las representaciones se construyeron utilizando Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

Con el objetivo de buscar elementos regulatorios en las secuencias UTR de los transcritos del grupo A, se realizó un análisis utilizando el algoritmo MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>; Bailey *et al.*, 2009), que permite identificar motivos consenso en un grupo de secuencias nucleotídicas. Utilizando los parámetros predeterminados del programa se encontraron 3 secuencias conservadas presentes en las regiones 5' UTR de los genes del grupo A (Figura 24). Las secuencias se denominaron 5UM1, 5UM2 y 5UM3 (por 5' *UTR motif*) para facilitar su referencia.

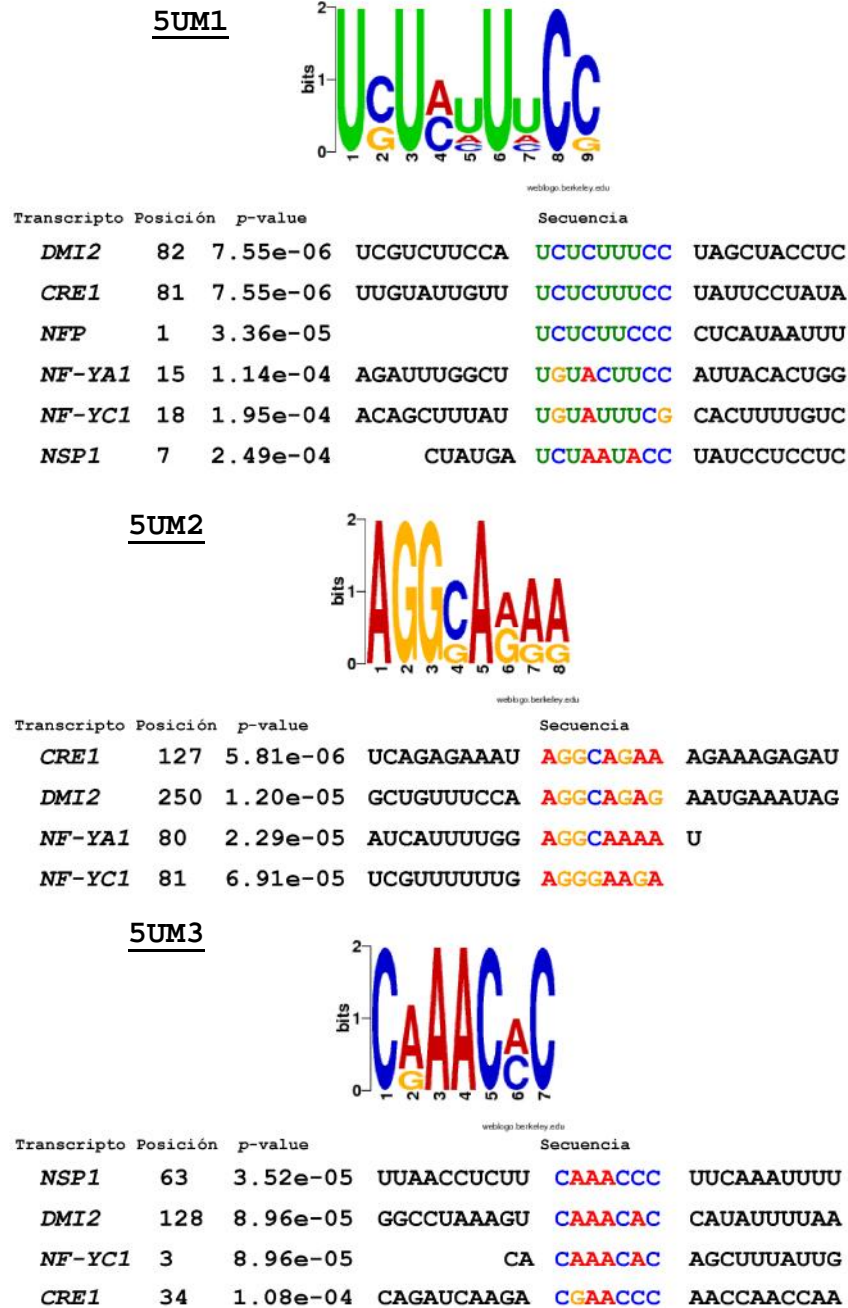


Figura 24. Secuencias consenso encontradas en la región 5' UTR de los transcritos del grupo A. Se grafican las secuencias 5UM1, 5UM2 y 5UM3 obtenidas a través del programa MEME (Bailey *et al.*, 2009). Los alineamientos indican la posición de la secuencia consenso a partir del primer nucleótido de la región no traducida para cada transcritos y el valor *p* calculado para el *match* encontrado.

Para verificar la especificidad de los motivos encontrados se utilizó el programa FIMO (Grant *et al.*, 2011), el cual permite identificar la presencia de estos motivos en las regiones 5' UTR de un transcritos en particular. Este análisis mostró que los motivos se encontraban presentes sólo en los transcritos del grupo A, y no en los de los grupos B y C (Figura 25). El motivo 5UM1, U[CG]U[AC]UUUCC, fue detectado en los 6 transcritos regulados positivamente a nivel traduccional, para los cuales se contaba con

la secuencia 5' UTR. El motivo 5UM2, AGG[CG]A[AG][AG][AG], se encontró presente en los transcritos *CRE1*, *DMI2*, *NF-YA1* y *NF-YC*. Por último 5UM3, C[AG]AAC[AC]C, fue detectado en los mRNAs que codifican los receptores *DMI2* y *CRE1* y los factores de transcripción *NSP1* y *NF-YC1*. Es de destacar que 5UM1 y 5UM2 se encuentran en una ubicación similar en los 5' UTR de *NF-YA1* y *NF-YC1* respecto del sitio de inicio de la traducción (Figura 25). Para evaluar si la presencia y ubicación de estos motivos es una característica de la familia *NF-Y* de *M. truncatula*, se buscaron ambos motivos en los 5' UTR de siete miembros *NF-YA*, doce *NF-YB* y seis *NF-YC* cuya secuencia se encuentra disponible (Laloum *et al.*, 2013). Por un lado, el motivo 5UM1 fue detectado en los transcritos *NF-YA4* y *NF-YB12*, y por otro lado, el 5UM2 fue encontrado en *NF-YA5*. Sin embargo, estos motivos no presentaron ubicaciones similares a las encontradas para *NF-YA1* y *NF-YC1*. Esta característica de los 5' UTR podría ser relevante para la expresión de estas subunidades del complejo NF-Y ya que se presenta en miembros que cumplen un rol clave en la formación del nódulo.

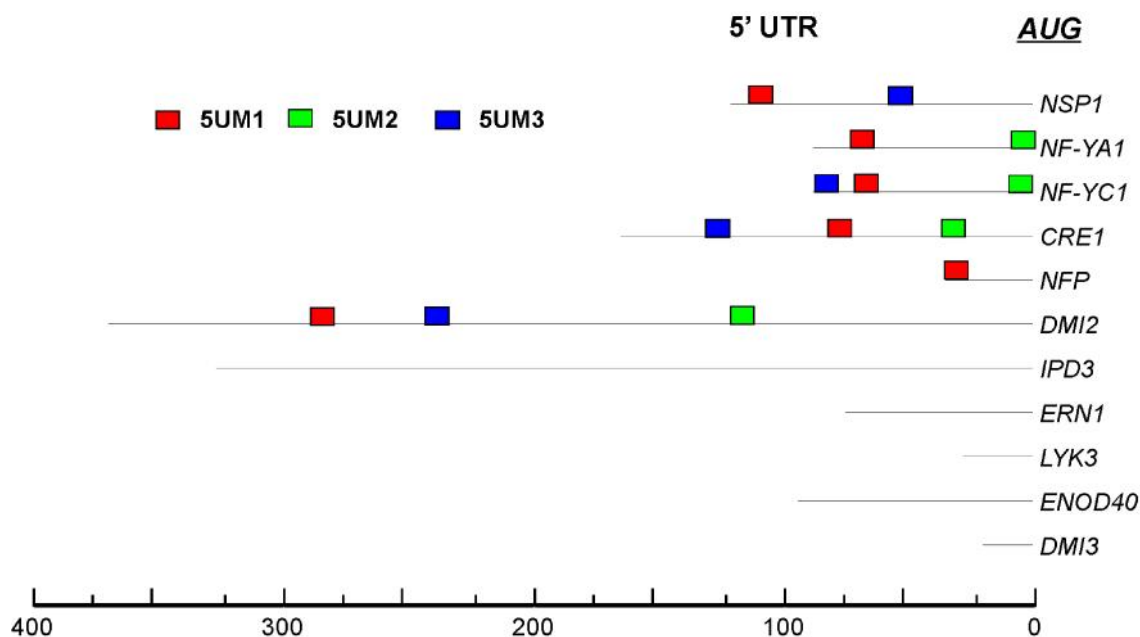


Figura 25. Localización de los motivos encontrados en la región 5' UTR de los transcritos del grupo A. Se muestra un esquema de la región 5'UTR de los transcritos respecto al codón de inicio AUG. Las cajas rojas, verdes y azules indican la ubicación de los motivos 5UM1, 5UM2 y 5UM3, respectivamente. Se muestra una escala en que representa la distancia como cantidad de nucleótidos *upstream* del AUG.

Por otro lado se realizó una búsqueda de motivos en las regiones 3'UTR de los transcritos del grupo A. Se encontraron tres motivos denominados 3UM (por 3'UTR *motif*). El motivo 3UM1, U[UA]C[CA][ACU][UG][AC]U[GU][GCU]U[AUG][CAG]

[UA][CAU][AUC][UG][GAU][CU][AG][ACU][CU]U[AC][AC], fue detectado en todos los transcritos del grupo A excepto en *NF-YC1*. El motivo 3UM2, A[GU]U[AG][AG][UG]UU [GC]GGUA[AC]AAUG[UA]A, estuvo presente en todos los transcritos del grupo A. Por último el motivo 3UM3, [AC][AG][CA][UA][CG][AU][AUG][CAGU][AC][UA][CU][UCG][CAG][UC][AU]GC[TA][ACGT][GA][GT], se detectó en todos los mRNAs de grupo A excepto en el transcripto *CRE1* (Figura 26).

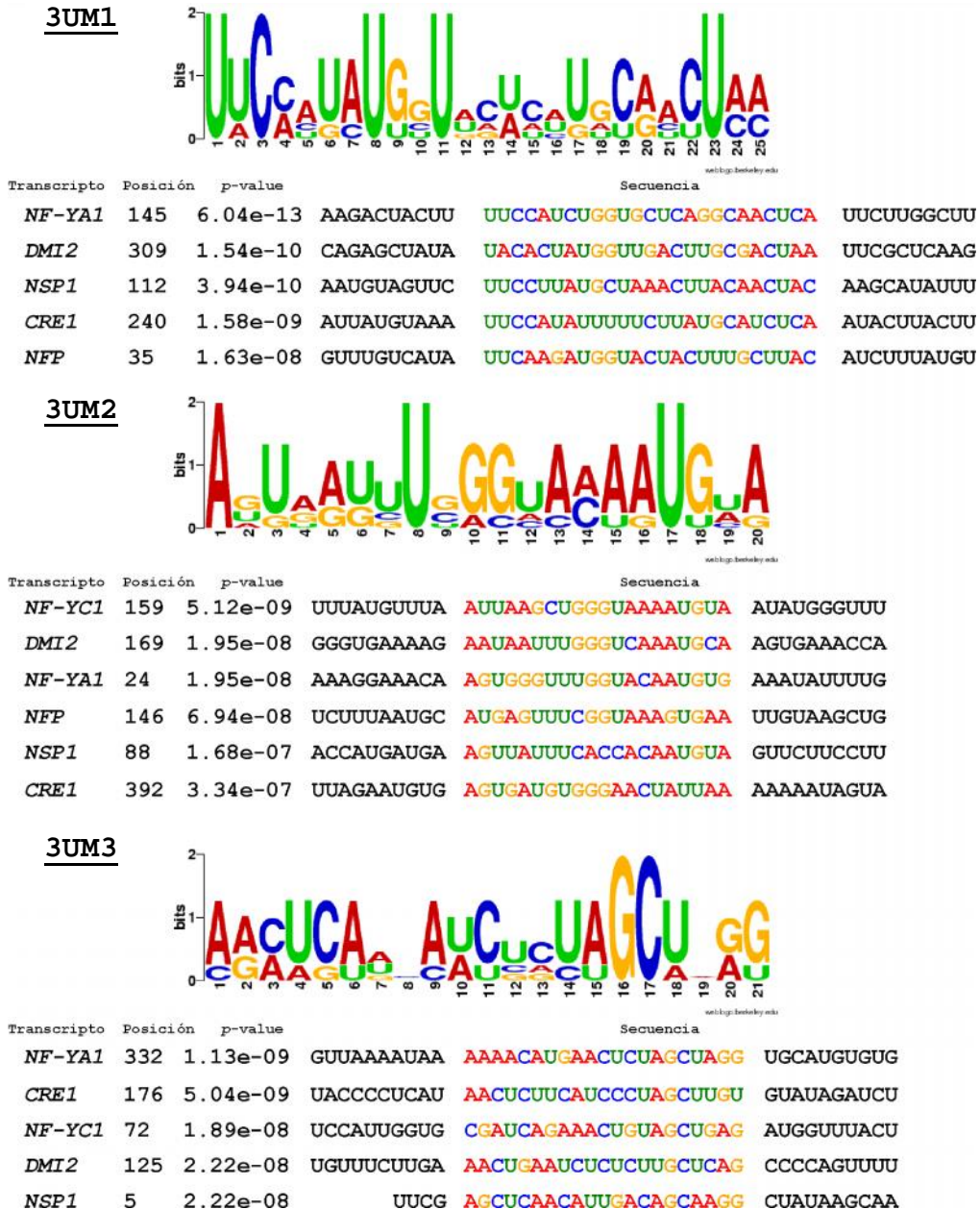


Figura 26. Secuencias consenso encontradas en la región 3' UTR de los transcritos del grupo A. Se grafican las secuencias 3UM1, 3UM2 y 3UM3 detectadas mediante el programa MEME (Bailey *et al.*, 2009). Los alineamientos indican la posición de la secuencia consenso a partir del primer nucleótido de la región no traducida para cada transcripto y el valor *p* calculado para el *match* encontrado.

En contraposición a lo observado en las regiones 5' UTR, el análisis mediante FIMO reveló la presencia de dos de los motivos en transcritos que no pertenecen al grupo A (Figura 27). Las secuencias 3' UTR de los transcritos *IPD3* y *NIN*, pertenecientes al grupo B, presentaron los motivos 3UM2 y 3UM3, respectivamente. Sin embargo, los valores *p* obtenidos en estos transcritos ( $4,71.e^{-05}$  y  $8,81.e^{-05}$  para los motivos 3UM2 e 3UM3, respectivamente) resultaron dos o más ordenes de magnitud mayores que en aquellos que conforman el grupo A, los cuales presentaron valores de *p* que oscilaron entre  $3,34.e^{-0.7}$  y  $6,04.e^{-13}$ .

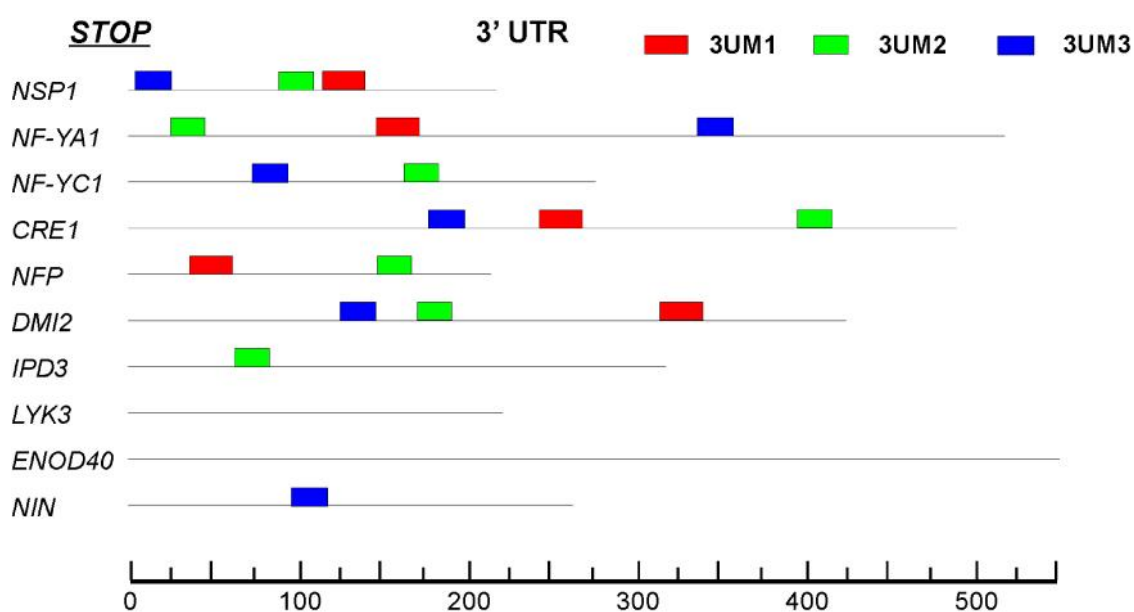


Figura 27. Localización de los motivos encontrados en la región 3' UTR de los transcritos del grupo A. Se muestra un esquema de la región 3' UTR de los transcritos analizados con respecto al codón *STOP*. Las cajas rojas, verdes y azules indican la ubicación de los motivos detectados, 3UM1, 3UM2 y 3UM3, respectivamente. Se indica una escala en que representa la distancia como cantidad de nucleótidos *downstream* del codón *STOP*.

A partir del análisis de los mRNAs seleccionados en este estudio se identificaron secuencias o motivos consenso que están presentes en las regiones no traducidas de aquellos genes que son regulados positivamente a nivel traduccional en respuesta al rizobio. Estos podrían representar elementos de respuesta traduccional que regulan positivamente la expresión génica durante la asociación simbiótica. Vale destacar que el análisis fue realizado con un número muy bajo de transcritos, ya que se circunscribió a aquellos genes para los que se contaba con información sobre su regulación a nivel traduccional. Con el fin de validar los resultados obtenidos deberá incluirse un mayor número de transcritos en el análisis, mejorando la significancia estadística que respalde la validez de las secuencias identificadas.

Los resultados descritos a lo largo de este capítulo permiten concluir que la inoculación con *S. meliloti* no afecta los perfiles de polisomas en etapas tempranas de la interacción simbiótica. Sin embargo, el reclutamiento diferencial de transcriptos a los polisomas contribuye significativamente a la regulación de mRNAs que codifican productos claves para la formación del nódulo, la infección bacteriana o ambas. Además, el análisis *in silico* de los mRNAs reveló la presencia de motivos consenso en las regiones UTR de los transcriptos regulados que podrían participar en el mecanismo de la regulación traduccional durante la simbiosis.



### **Capítulo III. TRAP para la obtención de traductomas de tipos celulares específicos de la raíz de *M. truncatula***

Los resultados descritos en el capítulo anterior indican que existe un reclutamiento diferencial de los transcritos a los polisomas y sugieren que esto contribuiría significativamente a la regulación de genes que codifican productos claves para la formación del nódulo en etapas tempranas de la interacción simbiótica con *S. meliloti*. Estas evidencias fueron encontradas analizando raíces completas, sin embargo, cada célula dentro de este órgano funciona en procesos especializados que en conjunto determinan el desarrollo de la simbiosis. La formación de un nódulo funcional depende de la activación en la raíz de dos programas separados espacialmente: el desarrollo del nódulo y la infección bacteriana (Oldroyd *et al.*, 2011). La organogénesis del nódulo comienza con la reactivación de las divisiones celulares en el córtex y el periciclo para formar el primordio nodular. Mientras que las bacterias ingresan, en la mayoría de las leguminosas, a través de la formación de hilos de infección en la epidermis. Además, existen evidencias del establecimiento de una continuidad simplásmica entre el floema, que transporta metabolitos requeridos para el desarrollo del nódulo, y las células del primordio nodular durante la formación del nódulo (Complainville *et al.*, 2003). Para alcanzar una mejor comprensión de este proceso a nivel molecular se requiere de tecnologías que permitan discriminar la contribución de la regulación génica a nivel de las células que determinan esta interacción. Como ya se mencionó en sección Introducción, la técnica de TRAP ha sido aplicada a la obtención de poblaciones de RNA asociados a los complejos traduccionales a partir de tipos celulares específicos en plantas de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009b, Jiao and Meyerowitz 2010). En este trabajo de tesis se propuso entonces utilizar esta metodología para aislar polisomas de la epidermis, córtex y floema de las raíces de *M. truncatula*, para acceder luego a los cambios en la asociación de los mRNAs a polisomas en dichos tipos celulares, los cuales participan activamente en las etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Con este objetivo se realizó una búsqueda de promotores que activen específicamente la transcripción en los tipos celulares mencionados. Se seleccionaron promotores en base a las evidencias disponibles de ensayos de hibridación *in situ* y direccionamiento de la expresión del gen *GUS*. Muchos de los promotores identificados con este criterio corresponden a genes cuya expresión es inducida por rizobios, como es

el caso de las nodulinas tempranas *ENOD11*, *ENOD12* y *RIP1* de epidermis (Journet *et al.*, 1994, Cook *et al.*, 1995, Journet *et al.*, 2001), *ENOD40* de córtex (Crespi *et al.*, 1994) y el receptor de citoquininas *CRE1* de córtex (Lohar *et al.*, 2006). Sin embargo, al aumentar su actividad en respuesta a la inoculación, los niveles de mRNA de *FLAG-RPL18* y de la proteína codificada serían mayores en raíces inoculadas que en raíces sin inocular. Estas diferencias podrían afectar los rendimientos del TRAP dependiendo del tratamiento de la raíz. A su vez, la incorporación de *FLAG-RPL18* a la subunidad mayor del ribosoma requiere que la proteína haya sido sintetizada previamente. Los promotores mencionados activan la transcripción a tiempos similares que los que se pretende evaluar la regulación traduccional, por lo que se descartó la posibilidad de utilizarlos en el contexto de la simbiosis. Debido a estas consideraciones se decidió trabajar con promotores cuya activación no dependiera de la inoculación por rizobio. En la Tabla 4 se presentan los candidatos seleccionados.

**Tabla 4.** Promotores utilizados para dirigir la expresión de *FLAG-RPL18* en *M. truncatula*

Promotor	Fuente	Número de acceso <sup>a</sup>	Longitud (pb)	Tipo celular blanco	Referencias
pEXP7	<i>M. truncatula</i>	DQ899790.1	324	Epidermis y pelo radical	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
pCO2	Arabidopsis	At1g62500	586	Córtex	(Heidstra <i>et al.</i> , 2004, Rival <i>et al.</i> , 2012)
pPEP	Arabidopsis	At1g09750	1667	Córtex	(Mace <i>et al.</i> , 2006)
pSUC2	Arabidopsis	At1g22710	2097	Células acompañantes del floema	(Imlau <i>et al.</i> , 1999)
CaMV 35S	Virus de mosaico de coliflor	V00140.1	1343	Raíz completa	(Odell <i>et al.</i> , 1985)

<sup>a</sup> Los identificadores de cada gen son los que se indican en el genoma de *A. thaliana*, para pEXP7 y CaMV 35S corresponde al número de acceso del GenBank.

Para epidermis y pelos radicales se evaluaron los promotores de los genes *MtPR10-1* y *MtEXP7*. *MtPR10-1* codifica para una proteína relacionada con la patogénesis y *MtEXP7* codifica para una expansina que participaría en el ensamblado de la pared celular en la morfogénesis del pelo radical (Ramos and Bisseling 2003, Kim *et al.*, 2006). Para amplificar el promotor de *MtPR10-1*, se diseñaron *primers* en base a la secuencia disponible del gen homólogo de *M. sativa* *MsPR10-1* debido a la ausencia de *MtPR10-1* en la base de datos del genoma de *M. truncatula*. Dado que no se obtuvieron resultados en la amplificación a partir de DNA genómico de *M. truncatula* para *MtPR10-1*, se continuó trabajando sólo con el promotor de *MtEXP7*. Este promotor fue previamente caracterizado en *M. truncatula* (Kim *et al.*, 2006). Su secuencia contiene regiones conservadas en los promotores de expansina de otras especies y activa la



expresión de GFP específicamente en tricoblastos (Kim *et al.*, 2006). La región promotora de *MtEXP7* se amplificó a partir de DNA genómico de *M. truncatula* y se realizó el reemplazo del promotor CaMV 35S en el plásmido 35S:FLAG-RPL18 (Figura 28). La construcción obtenida se denominó EXP7:FLAG-RPL18.

Para el tejido cortical se seleccionaron dos promotores de Arabidopsis, pCO<sub>2</sub> y pPEP, que dirigen la expresión de una proteína de unión a lípidos y una peptidasa del tipo aspártico, respectivamente (Heidstra *et al.*, 2004, Mace *et al.*, 2006). Para ambos casos se solicitaron las construcciones generadas previamente, que contienen cada promotor dirigiendo la expresión la proteína de fusión de FLAG a RPL18B de Arabidopsis (Mustroph *et al.*, 2009b). Se realizó el clonado con enzimas de restricción para reemplazar el ORF de RPL18B de Arabidopsis por el correspondiente de *M. truncatula* (Figura 28). Las construcciones obtenidas se denominaron CO<sub>2</sub>:FLAG-RPL18 y PEP:FLAG-RPL18. Un trabajo reciente confirmó que pCO<sub>2</sub> de Arabidopsis dirige la expresión de *GUS* a las células corticales de *M. truncatula* (Rival *et al.*, 2012). En base a esta evidencia se decidió continuar los estudios con la construcción que contiene el promotor pCO<sub>2</sub>.

Para el tejido de floema se seleccionó el promotor del gen *SUC2* de Arabidopsis (Tabla 4) que dirige la expresión del transportador de sacarosa 2 en las células acompañantes del floema, tanto en raíces como en parte aérea (Imlau *et al.*, 1999). Además, pSUC2 fue utilizado previamente con éxito para la expresión de GFP en raíces de *M. truncatula* (Complainville *et al.*, 2003). Al igual que para pCO<sub>2</sub>, se solicitó la construcción utilizada para Arabidopsis y se realizó el reemplazo por el ORF de RPL18 de *M. truncatula* (Figura 28). La construcción se denominó SUC2:FLAG-RPL18 (Figura 28).

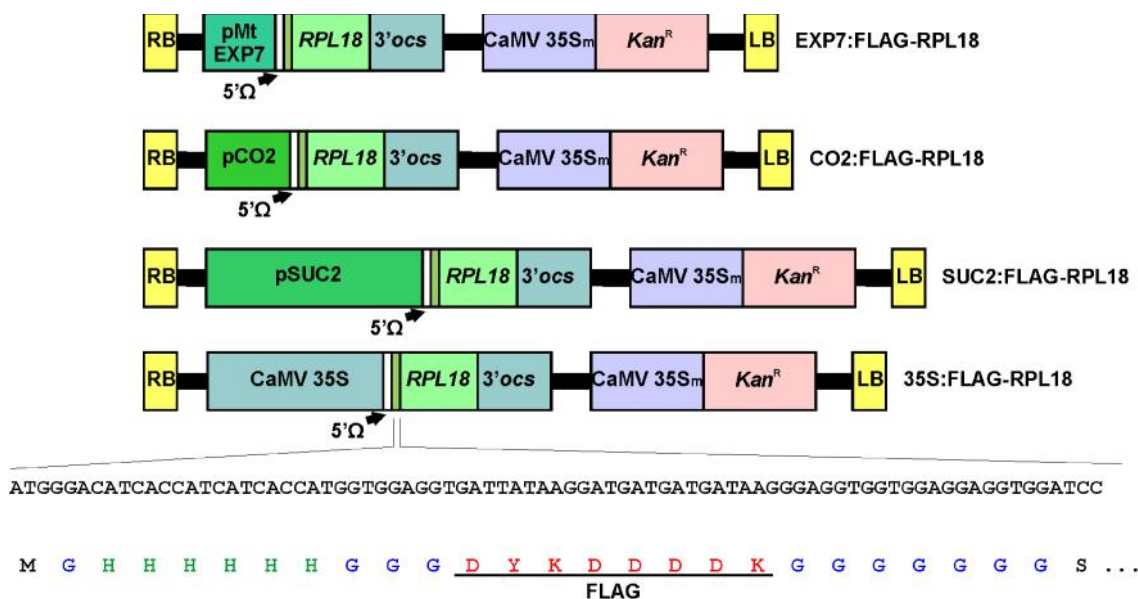
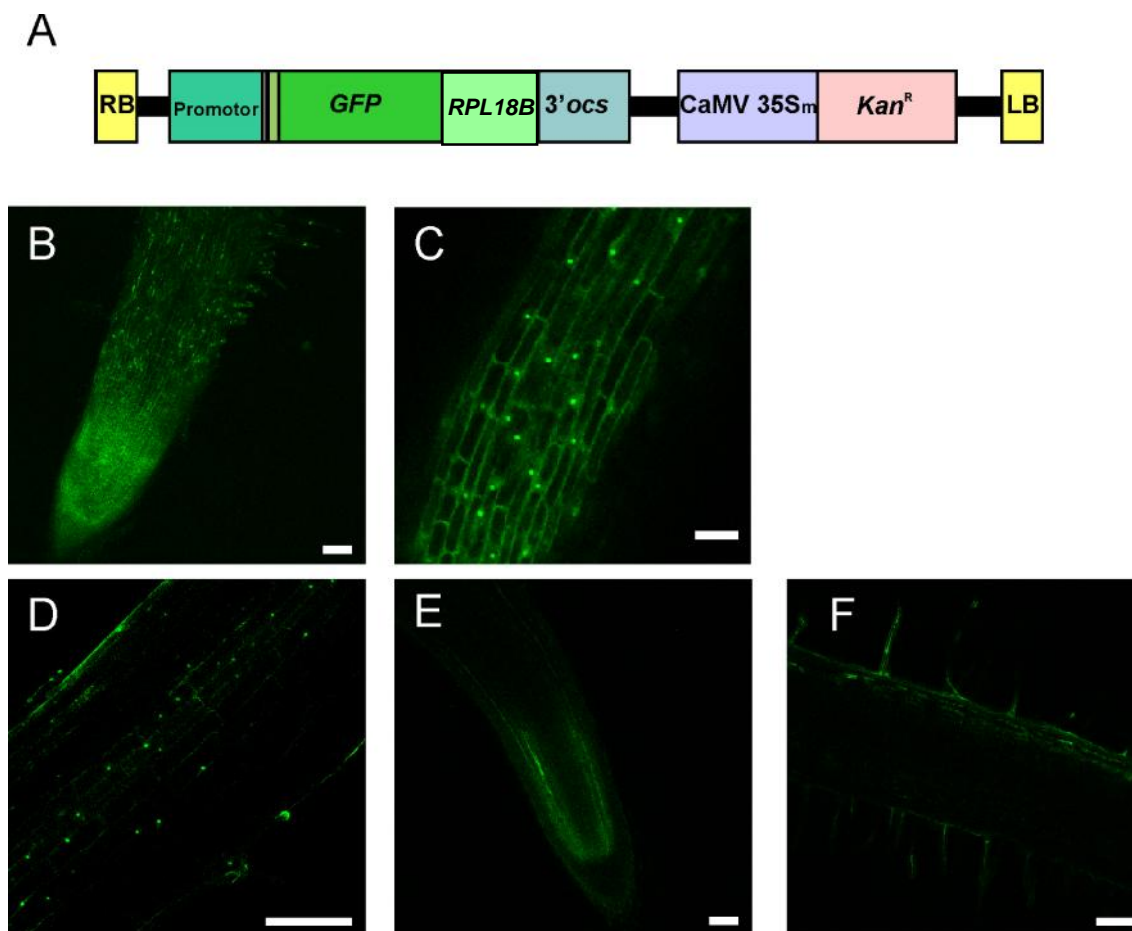


Figura 28. Regiones del T-DNA de los plásmidos utilizados para dirigir la expresión de FLAG-RPL18 en tipos celulares específicos de la raíz. Las construcciones EXP7:FLAG-RPL18, CO2:FLAG-RPL18, SUC2:FLAG-RPL18 y 35S:FLAG-RPL18 permiten la expresión dirigida por los promotores de expansina pEXP7, de la proteína de unión a lípidos pCO2, del transportador de sacarosa 2 pSUC2 y del virus de mosaico de coliflor CaMV 35S, respectivamente. Se indican las regiones correspondientes a las secuencias de bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA, el promotor 35S mínimo (CaMV 35Sm), las regiones no traducidas 5' y 3' del gen de octopina sintasa (*ocs*), y el gen que confiere la resistencia a kanamicina (*Kan<sup>R</sup>*), *nptII*. Se muestra la secuencia de DNA y proteína de la región correspondiente a los epitopes en la construcción 35S:FLAG-RPL18. En azul se destacan los residuos de glicina, en verde los de histidina y en rojo a los correspondientes al péptido FLAG.

Para evaluar la actividad de los promotores seleccionados en raíces de *M. truncatula*, se realizaron fusiones a GFP. Se utilizaron construcciones que contienen los promotores pCO2, pSUC2 y CaMV 35S dirigiendo la expresión de GFP fusionada a RPL18B de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009b). Se decidió probar estas construcciones sin reemplazar la RPL18B en base al alto porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas de *Arabidopsis* y la de *M. truncatula* (Figura 8). En el caso del promotor pEXP7 se incorporó la secuencia de GFP a la construcción generada para la expresión de FLAG-RPL18 para obtener la fusión FLAG-GFP-RPL18. Esta construcción fue verificada por secuenciación (Anexo I). Las construcciones resultantes (Figura 29A) se introdujeron en *A. rhizogenes* para generar plantas compuestas y se visualizaron las raíces transgénicas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para las raíces transformadas con la construcción 35S:FLAG-GFP-RPL18B, se detectó fluorescencia en las células de las zonas meristemática y de elongación de la raíz (Figura 29B y C). La proteína FLAG-GFP-RPL18B mostró un patrón de localización subcelular disperso entre el citoplasma y el nucleolo (Figura 29C), similar al observado en células de la raíz de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009b). El promotor pSUC2

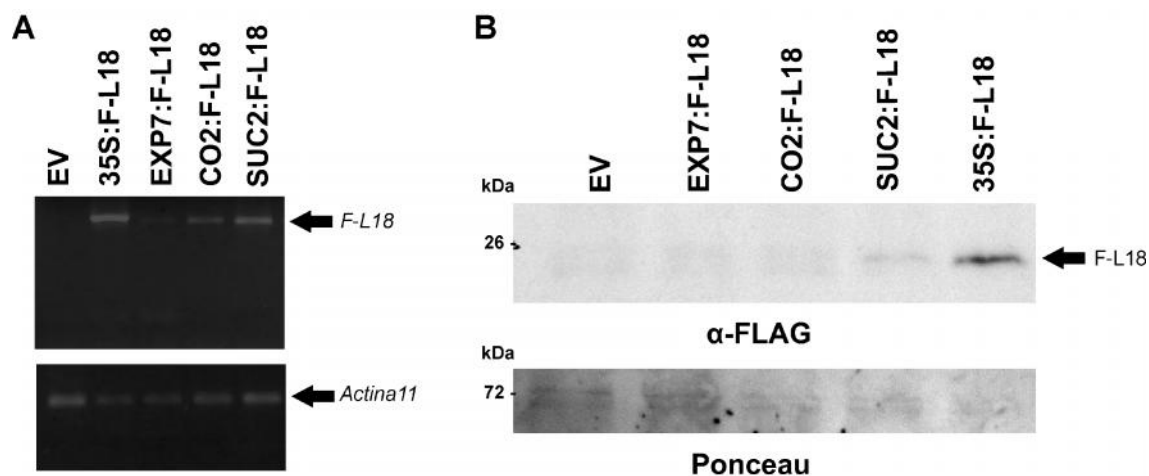
dirigió la expresión en las células del floema tal como se observa en la Figura 29D, donde también se observó una localización citoplasmática y nucleolar. Por otro lado, el promotor pCO2 dirigió la expresión de FLAG-GFP-RPL18B en células corticales de la región meristemática de la raíz (Figura 29E), tal como fue reportado previamente (Rival *et al.*, 2012). Sin embargo, en las células corticales de la zona de elongación, se detectaron niveles de fluorescencia muy débiles. Este dato también coincide con lo reportado previamente para la fusión FLAG-GFP-RPL18B bajo este promotor en raíces de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009b). Por último, el promotor pEXP7 dirigió la expresión a células epidérmicas y tricoblastos (Figura 29F). Estos datos permitieron confirmar que los promotores utilizados dirigieron la expresión de FLAG-GFP-RPL18B a los tipos celulares esperados y que la proteína de fusión se acumula en dichos tipos celulares. Además, estos patrones de expresión y localización subcelular en raíces de *M. truncatula* no cambiaron como consecuencia de la infección con *S. meliloti* (dato no mostrado). A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar con la transformación de raíces de *M. truncatula* utilizando las construcciones presentadas en la Figura 28, las cuales no contienen la fusión a GFP, para aislar los polisomas de los tipos celulares seleccionados. Si bien la fusión a GFP permite visualizar los tipos celulares que acumulan la proteína FLAG-GFP-RPL18B, estas construcciones no se utilizaron para los ensayos de TRAP dado que la proteína de fusión a GFP se incorpora a los ribosomas, pero los ribosomas que la contienen no se incorporan eficientemente en los polisomas (Mustroph *et al.*, 2009b).



**Figura 29. Expresión de FLAG-GFP-RPL18B en tipos celulares de la raíz de *M. truncatula*.** A. Se utilizaron construcciones para dirigir la expresión de GFP fusionada a RPL18 bajo el control de los promotores presentados en la Tabla 4. Se indican las secuencias de bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA, el promotor 35S mínimo (CaMV 35Sm), la región no traducida 3' *ocs*, el gen que codifica la proteína GFP y el gen que confiere resistencia a kanamicina (*Kan<sup>R</sup>*, *nptII*). Las raíces transformadas fueron observadas mediante microscopía confocal en plantas compuestas transformadas con FLAG-GFP-RPL18B bajo el control del promotor CaMV 35S (B y C), pSUC2 (D), pCO2 (E) y pEXP7 (F). Se muestra la distribución entre citoplasma y nucleolo (C). La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

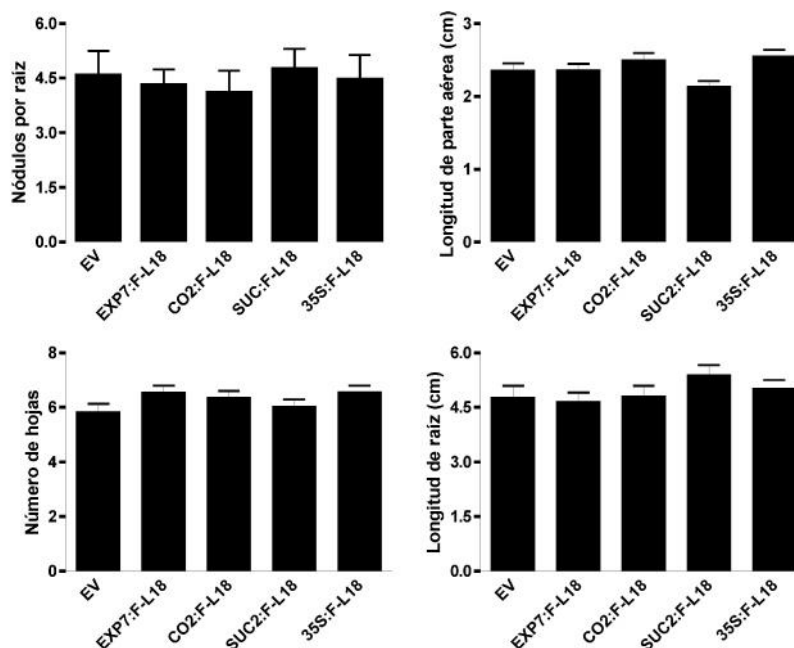
Se obtuvieron eficiencias de transformación cercanas al 65 % para las construcciones EXP7:FLAG-RPL18, CO2:FLAG-RPL18, SUC2:FLAG-RPL18 y 35S:FLAG-RPL18. A partir de las plantas compuestas generadas se aisló RNA de las raíces para verificar la expresión del transgén mediante RT-PCR semicuantitativo. Para la amplificación se utilizó un *primer* correspondiente al inicio de la región codificante de *RPL18* y otro dentro de la zona 3' no traducida del gen de la octopina sintasa (*ocs*). De esta manera sólo se obtiene un producto de amplificación a partir de los transcritos provenientes de la expresión del transgén y no del gen endógeno. Se detectó un producto de amplificación del tamaño esperado para el mRNA *FLAG-RPL18-OCS* a partir de raíces transformadas con cada una de las construcciones, mientras que no se produjo amplificación a partir de raíces transformadas con el vector vacío (Figura 30A).

Por otro lado, se evaluó la expresión de la proteína FLAG-RPL18 en las raíces transformadas mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos que reconocen el péptido FLAG. En estos ensayos fue detectada una proteína con movilidad electroforética de 25 kDa (que corresponde a la masa molecular esperada para FLAG-RPL18) en los extractos proteicos provenientes de raíces transformadas con 35S:FLAG-RPL18 y SUC2:FLAG-RPL18 (Figura 30B). Para CO2:FLAG-RPL18 y EXP7:FLAG-RPL18 no fue posible detectar la señal, posiblemente debido al bajo número de células que expresan la proteína y la limitada sensibilidad de la técnica. De acuerdo a lo esperado, esta señal no fue detectada en las plantas transformadas con el vector vacío.



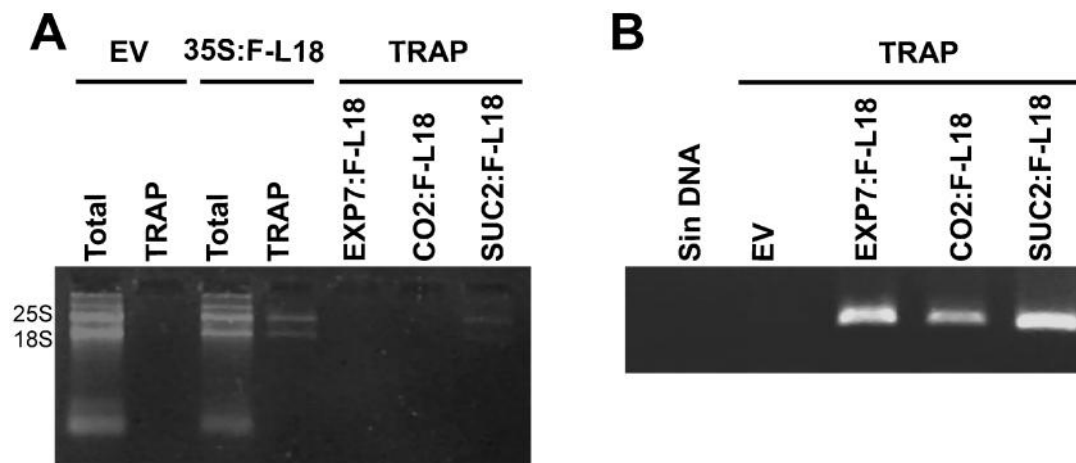
**Figura 30. Evaluación de la expresión de FLAG-RPL18 en raíces de plantas compuestas.** A. Detección del transcripto *FLAG-RPL18-OCS* (*F-L18*). El RNA total de las raíces transformadas con las construcciones 35S:HF (EV), 35S:FLAG-RPL18 (35S:F-L18), EXP7:FLAG-RPL18 (EXP7:F-L18), CO2:FLAG-RPL18 (CO2:F-L18) y SUC2:FLAG-RPL18 (SUC2:F-L18) fue analizado por RT-PCR para amplificar el transcripto de *FLAG-RPL18-OCS* que corresponde al transgén expresado. Se utilizó el *primer RPL18 fwd* ubicado al inicio de la región codificante de *RPL18* y el *primer 3'ocs rev* ubicado en la región 3'UTR *ocs*. El tamaño esperado corresponde a 646 pb. En el panel inferior se muestra la amplificación de *ACTINA11* a partir de las mismas muestras. Las flechas indican el fragmento de amplificación esperado para cada transcripto. B. Detección de la proteína FLAG-RPL18. *Western blot* sobre extractos de raíces transformadas utilizando anticuerpos contra el péptido FLAG (-FLAG). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína FLAG-RPL18. A la izquierda, se indica la masa molecular de los marcadores en kDa. En el panel inferior se muestra una región de la membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau.

Para evaluar un posible efecto de la expresión de FLAG-RPL18 en estos tipos celulares sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, se evaluó la longitud de la raíz y de la parte aérea, el número de hojas y el número de nódulos desarrollados 15 días luego de la inoculación con *S. meliloti*. No se observaron diferencias significativas en el desarrollo y la nodulación entre plantas que expresan FLAG-RPL18 y plantas transformadas con el vector vacío (Figura 31).



**Figura 31. Evaluación fenotípica de plantas compuestas que expresan FLAG-RPL18 en los diferentes tipos celulares.** Se analizaron plantas transformadas con las construcciones 35S:HF (EV), EXP7:FLAG-RPL18 (EXP7:F-L18), CO2:FLAG-RPL18 (CO2:F-L18), SUC2:FLAG-RPL18 (SUC2:F-L18) y 35S:FLAG-RPL18 (35S:F-L18). El número de nódulos por raíz formados en plantas compuestas fue evaluado luego de 16 días de la inoculación con *S. meliloti*. El número de hojas, la longitud de la parte aérea y la longitud de la raíz fueron cuantificados en plantas compuestas de 20 días. Las barras representan la media  $\pm$  el desvío estándar.

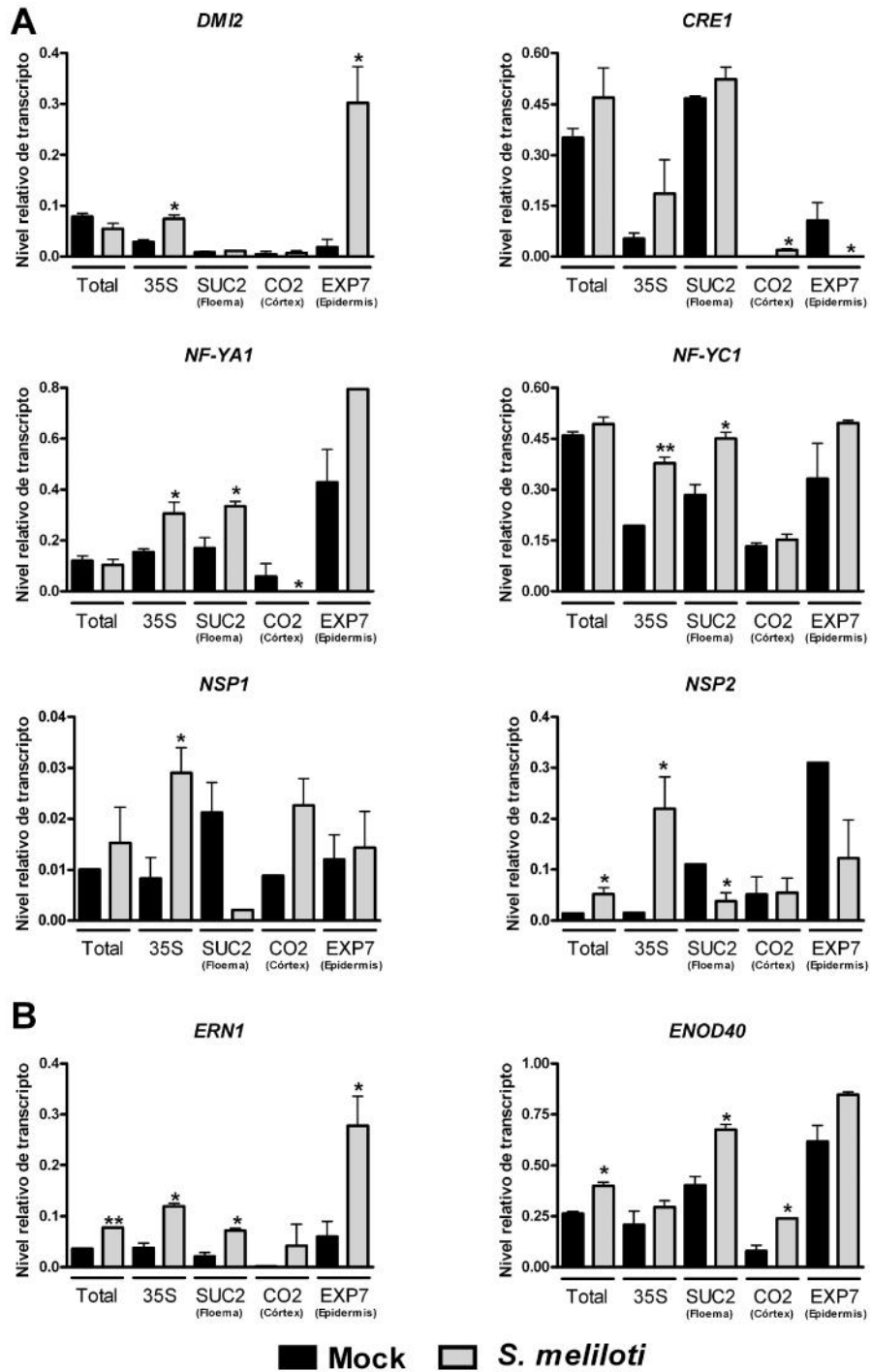
Una vez descartado un efecto fenotípico evidente por la expresión de FLAG-RPL18, se procedió a realizar la inmunopurificación de polisomas de los distintos tipos celulares utilizando el mismo procedimiento que para plantas compuestas transformadas con la construcción 35S:FLAG-RPL18. La separación del RNA en un gel de agarosa mostró la presencia de los rRNA 25S y 18S a partir de TRAP de raíces 35S:FLAG-RPL18 y SUC2:FLAG-RPL18 (Figura 32A). Sin embargo, no fue posible visualizar los rRNA en muestras TRAP de raíces que expresan FLAG-RPL18 en tipos celulares poco abundantes como epidermis (pEXP7) y córtex (pCO2). No obstante, una reacción de RT-PCR semicuantitativa utilizando *primers* correspondientes a un transcripto abundante como *ACT11* permitió detectar el producto de amplificación a partir del RNA de TRAP de epidermis, córtex y células acompañantes del floema, confirmando la presencia de mRNAs en las muestras TRAP provenientes de los diferentes tipos celulares (Figura 32B). No se obtuvo amplificación del transcripto de *ACT11* a partir de raíces transformadas con el vector vacío (EV), confirmando la especificidad de la inmunopurificación. Las intensidades de las bandas de amplificación de *ACT11* se correlacionaron con los rendimientos reportados previamente en plántulas de *Arabidopsis* utilizando pCO2 y pSUC2 (Mustroph *et al.*, 2013).



**Figura 32. TRAP en raíces de *M. truncatula* a partir de tipos celulares específicos.** **A.** Se muestra el RNA total o purificado mediante TRAP a partir de raíces transformadas con el vector vacío 35S:HF (EV) o 35S:FLAG-RPL18 (35S:F-L18) y TRAP de raíces transformadas con EXP7:FLAG-RPL18 (EXP7:F-L18), CO2:FLAG-RPL18 (CO2:F-L18) y SUC2:FLAG-RPL18 (SUC2:F-L18). La migración de los rRNAs 25S y 18S se indican a la izquierda. **B.** Los RNA de muestras TRAP fueron analizados por RT-PCR semicuantitativa para amplificar el transcrito de *ACT11*. La primera calle es el control de amplificación sin DNA.

En base a los rendimientos obtenidos, se tomó la decisión de aumentar la cantidad de plantas transformadas con las construcciones cuyo rendimiento de RNA era muy bajo. Se realizó TRAP a partir de las raíces de plantas compuestas EXP7:FLAG-RPL18, CO2:FLAG-RPL18 y SUC2:FLAG-RPL18 inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control, utilizando cuatro veces el volumen de tejido utilizado para las plantas 35S:FLAG-RPL18. A pesar de ello, no fue posible visualizar el rRNA en geles de agarosa. Sin embargo, sí pudo verificarse un aumento en el rendimiento de RNA determinado por medición de la absorbancia de las muestras a 260 nm. Esto se confirmó también mediante una cuantificación por RT-qPCR de los niveles de *ACT11* en muestras de TRAP obtenidas a partir de mayor cantidad de tejido inicial (datos no mostrados).

A partir del RNA obtenido se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de los transcritos asociados a polisomas en cada tejido en raíces inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control mediante RT-qPCR. Se cuantificaron los transcritos de la vía de señalización de nodulación *NFP*, *CRE1*, *DMI2*, *NF-YA1*, *NF-YC1*, *NSP1* y *NSP2*, los cuales mostraron regulación traduccional positiva de acuerdo a los resultados presentados en el Capítulo II. Se verificó el incremento diferencial en respuesta al rizobio en muestras TRAP de plantas transformadas con 35S:FLAG-RPL18 en comparación con muestras totales para cada uno de los transcritos seleccionados (Figura 33A).



**Figura 33. Asociación selectiva de transcritos a polisomas de tipos celulares específicos en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.** **A** Cuantificación de transcritos que presentan regulación positiva a nivel traduccional en la raíz completa. **B** Cuantificación de dos transcritos cuya abundancia y asociación a polisomas aumentan en respuesta a la infección. Se muestran los niveles de transcritos medidos por RT-qPCR en muestras de RNA total o asociado a polisomas purificados mediante TRAP. Se utilizaron raíces de *M. truncatula* que expresan FLAG-RPL18 bajo el promotor CaMV 35S (35S:F-L18), de floema pSUC2 (SUC2:F-L18), de córtex pCO2 (CO2:F-L18) y de epidermis pEXP7 (EXP7:F-L18). Se inocularon las raíces con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras). Las muestras se tomaron a 48 hpi. Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de cómo mínimo dos réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcripto *HIS3L*. Los asteriscos indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras Mock correspondientes a la misma construcción en un *t*-test de Student no apareado de dos colas con  $0,01 < P < 0,05$  (\*) y  $0,001 < P < 0,01$  (\*\*).



En cuanto a las muestras TRAP de tipos celulares específicos se puede destacar que se encontraron respuestas diferenciales para cada transcripto. Los transcriptos del receptor *DMI2* presentaron mayores niveles de mRNAs asociados a ribosomas en muestras de células epidérmicas. Luego de la inoculación los niveles detectados en epidermis se incrementaron alrededor de 9 veces (Figura 33A). Este resultado coincide con los resultados obtenidos a partir de ensayos de fusión del promotor a *GUS* para este gen, donde se detectó expresión en células de la epidermis y su acumulación en respuesta a la inoculación (Bersoult *et al.*, 2005). Sin embargo, en dicho reporte también se observó tinción en células corticales en respuesta a la inoculación, lo cual no coincide con los resultados obtenidos mediante TRAP en este tipo celular para el que no se observaron cambios (Figura 33A). Esta discrepancia puede deberse a diferencias en la actividad del promotor y/o la abundancia de los transcriptos de *DMI2* respecto de su reclutamiento a polisomas, a la sensibilidad de la técnica en muestras con bajo rendimiento o a los bajos niveles de expresión de pCO<sub>2</sub> en la zona de elongación. Los transcriptos del receptor de citoquininas *CRE1* se detectaron mayoritariamente en muestras de RNA asociado a los polisomas de células acompañantes del floema (Figura 33A), pero los niveles no variaron significativamente en respuesta a la inoculación. También se detectaron mRNAs de *CRE1* en muestras TRAP de epidermis sin inocular y se observó una disminución significativa para este tejido en respuesta al rizobio (Figura 33A). Además, se detectaron transcriptos en las muestras TRAP de células corticales inoculadas. Este resultado está de acuerdo con un estudio previo en el cual el promotor *CRE1* dirigió la expresión del gen *GUS* en las células corticales de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Lohar *et al.*, 2006). Para *NF-YA1* los mayores niveles se encontraron en las células epidérmicas. Luego de la inoculación los niveles aumentaron casi al doble en células epidérmicas y del floema. En oposición a lo encontrado en esos tejidos, no se detectaron transcriptos de *NF-YA1* en las células corticales luego de la inoculación. *NF-YC1* mostró un comportamiento similar al obtenido para *NF-YA1* en cuanto a que su acumulación mayoritaria se encontró en epidermis y floema. En respuesta a la inoculación se observó un aumento del 60 % de los niveles en floema mientras que en las células epidérmicas se observó un aumento similar que al igual que la pequeña variación en córtex no resultó estadísticamente significativa. Los transcriptos de *NSP1* y *NSP2* mostraron una acumulación mayoritaria en floema y epidermis, respectivamente. Ambos transcriptos mostraron una disminución de sus niveles en floema en respuesta a

la inoculación cercana al 80 % y 65 %, respectivamente. Esta disminución fue acompañada de un incremento en las células corticales para *NSP1*. Para *NSP2* si bien se observó una disminución en células epidérmicas en respuesta a la inoculación, esta variación no resultó estadísticamente significativa. De todos modos se observó que los niveles de *NSP1* y *NSP2* asociados a polisomas aumentan en respuesta a la inoculación en las muestras de raíces completas (Figura 20 y Figura 33A). Este resultado plantea la posibilidad de que el incremento en la asociación a polisomas ocurra en otros tejidos de la raíz que no fueron analizados en este trabajo. Por último, los transcritos de *NFP* fueron detectados en muestras de TRAP de floema, y éstos no presentaron variaciones significativas en respuesta a la inoculación. Sin embargo, no fue posible detectar transcritos de *NFP* en muestras TRAP de epidermis y córtex (datos no mostrados). Posiblemente este resultado se debe al bajo rendimiento de RNA obtenido de epidermis, ya que en un trabajo previo en donde se ensayó una fusión de promotor *NFP* a *GUS* se observó tinción en pelos radicales de raíces laterales sin inocular y, a 48 horas luego de la inoculación, en células corticales internas cercanas a los sitios de infección (Arrighi *et al.*, 2006). Además, este resultado se podría explicar en base a la baja abundancia de los transcritos de *NFP*, tal como se observó para RNA total, lo que dificultaría su detección en muestras con bajos rendimientos de RNA como TRAP de córtex y epidermis.

Por otro lado se cuantificaron los niveles de *ERN1* y *ENOD40* como ejemplos de dos transcritos cuyos niveles estacionarios de mRNA y su asociación a ribosomas se incrementan en respuesta al rizobio. En ambos casos se confirmó este comportamiento (Figura 33B), obteniéndose para *ENOD40* incrementos de un 50 % en respuesta a la inoculación en muestras de RNA Total y TRAP de plantas 35S:FLAG-RPL18. Este incremento fue similar para las muestras TRAP de células epidérmicas y del floema, mientras que el incremento en células del córtex fue cercano a 2 veces. Estos datos concuerdan con los resultados de hibridación *in situ* que muestran la presencia de los transcritos de *ENOD40* en células corticales en división de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Crespi *et al.*, 1994). Para el caso de *ERN1* se encontraron incrementos en los 3 tipos celulares analizados en respuesta a la inoculación (Figura 33B), detectándose los mayores niveles en células epidérmicas inoculadas. Estos resultados concuerdan con lo encontrado mediante ensayos de fusión de promotor a *GUS* (Cerri *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que es factible aplicar la técnica de TRAP para aislar RNA asociado a polisomas de tipos celulares específicos de la raíz de *M. truncatula*. La cuantificación de transcritos individuales de la vía de señalización activada durante la nodulación mostró que existen comportamientos diferentes para un mismo transcritos dependiendo del tipo celular examinado. Esto permite visualizar los cambios en la expresión génica en los tejidos específicos involucrados las etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Esta validación abre la posibilidad de realizar estudios a escala global con muestras de tipos celulares específicos con el objetivo de discriminar la contribución de cada tipo celular al desarrollo de la simbiosis, contribuyendo así a alcanzar una mejor comprensión del proceso asociativo.

## **Capítulo IV. Análisis de pequeños RNA asociados a la maquinaria traduccional en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno**

Los miRNAs de animales pueden actuar tanto a través de la represión de la traducción como mediante la desestabilización de sus genes blanco (Fabian *et al.*, 2010, Guo *et al.*, 2010). Si bien aun no se conocen los detalles del mecanismo de acción a nivel traduccional, se ha encontrado que los miRNAs se asocian a polisomas (Maroney *et al.*, 2006, Nottrott *et al.*, 2006). En plantas, por el contrario, ha sido largamente aceptado que los miRNAs actuarían principalmente mediante el clivaje de sus transcritos blanco (Voinnet 2009). Sin embargo, estudios llevados a cabo en la dicotiledónea modelo *A. thaliana* han sugerido que los miRNAs también podrían actuar limitando la traducción de sus mRNAs blanco (Aukerman and Sakai 2003, Chen 2004, Brodersen *et al.*, 2008, Lanet *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2012). Estas evidencias nos llevaron a plantear como objetivo investigar la asociación de sRNAs a la maquinaria traduccional en raíces de *M. truncatula* y los cambios en dicha asociación en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.

El primer paso fue seleccionar los sRNAs a ensayar en este estudio. El análisis se enfocó en sRNAs que poseen una función asignada durante el proceso de nodulación, o bien aquellos cuyos niveles se modifican significativamente en nódulos. Una lista completa de los sRNAs evaluados, así como sus mRNAs blanco, se presenta en la Tabla 5. Se seleccionaron los miRNAs de 21 nts miR166, miR169 y miR171, cuyos mRNAs blanco son los factores de transcripción HD-Zip III, NF-YA y NSP2, respectivamente, los cuales han sido involucrados en la nodulación y/o infección rizobiana (Combiere *et al.*, 2006, Boualem *et al.*, 2008, De Luis *et al.*, 2012). También se incluyeron en el estudio miRNAs que aumentan sus niveles estacionarios en nódulos de *M. truncatula* respecto de raíces no inoculadas: miR160, miR172 y miR2609 (Lelandais-Briere *et al.*, 2009). Asimismo, se incluyeron los miRNAs miR390 y miR396, ya que sus niveles disminuyen en nódulos respecto a raíces no inoculadas (Lelandais-Briere *et al.*, 2009) y el tasiARFs, derivado del clivaje del precursor de *TAS3* por acción de miR390 (Jagadeeswaran *et al.*, 2009). Además se estudiaron los miRNAs de 22 nt miR1509 y miR2118, que han sido caracterizados como altamente abundantes en *M. truncatula* y llevan a la producción de phasiRNAs derivados de transcritos de la familia NBS-LRR (Zhai *et al.*, 2011).

Para investigar la asociación de estos sRNAs a polisomas, se cuantificaron los sRNAs seleccionados en muestras de RNA total y TRAP mediante RT-qPCR. Para ello, se utilizó el kit miScript comercializado por la empresa QIAGEN. Como se muestra en la Figura 34, el sistema consiste en la poliadenilación de los extremos 3' de los sRNAs seguido de la transcripción reversa, utilizando un *primer* que contiene una región poliT y una secuencia correspondiente al *primer* denominado universal por el fabricante. A partir del cDNA sintetizado es posible amplificar por PCR cada sRNA con un *primer* específico para el sRNA a medir y el *primer* universal, cuya secuencia se encuentra dentro del producto de la transcripción reversa. Este procedimiento reduce la hibridación inespecífica encontrada en ensayos de *Northern blot* y es altamente sensible, permitiendo la detección de sRNAs a partir de 10 pg de RNA inicial (Lee *et al.*, 2007). Esta metodología ha sido utilizada previamente para cuantificar miRNAs maduros en RNA aislado de polisomas de células humanas (Janas *et al.*, 2012).

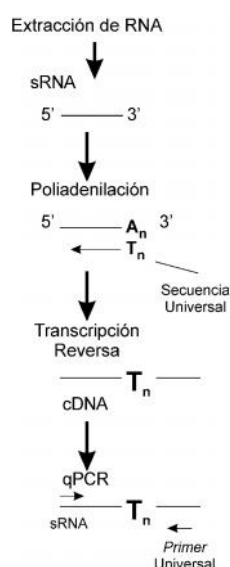
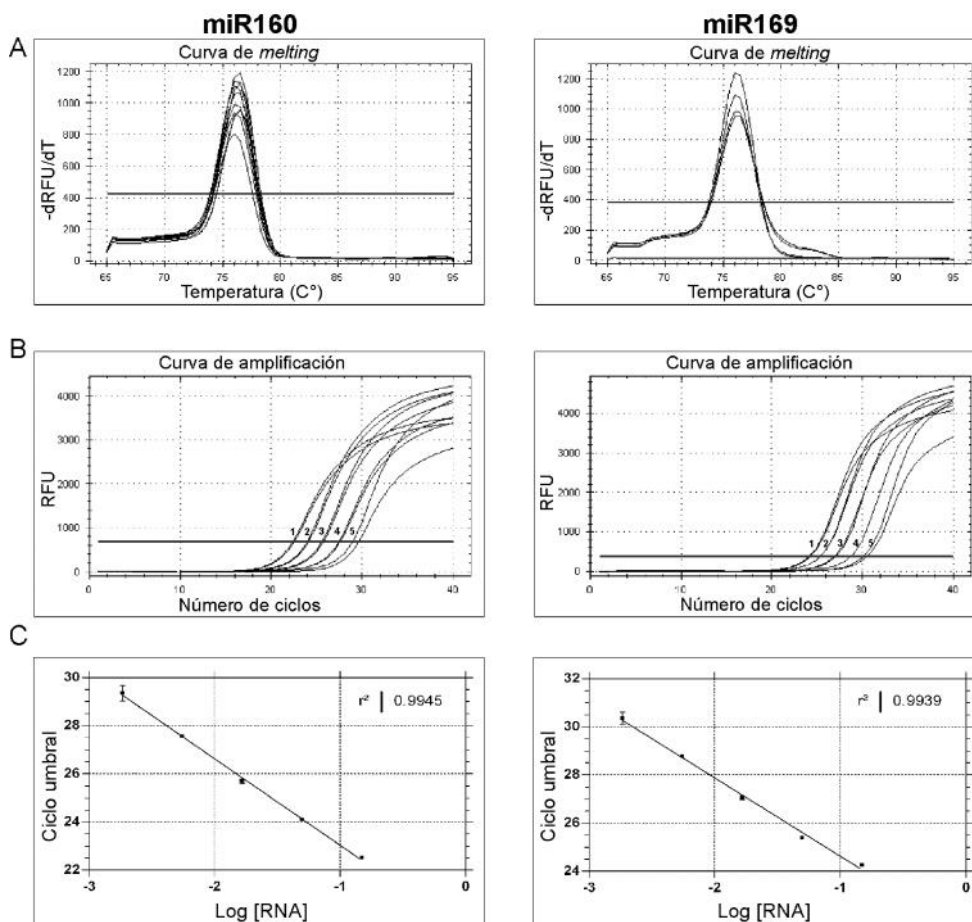


Figura 34. Esquema del sistema miScript para cuantificar sRNAs. Se representan los pasos de poliadenilación de los sRNAs y la transcripción reversa utilizando un *primer* cuya secuencia incluye, además de una secuencia de poliT (T<sub>n</sub>), una secuencia de nucleótidos denominada universal. A partir del cDNA generado, los niveles de sRNA son cuantificados mediante qPCR utilizando el *primer* universal y otro correspondiente al sRNA de interés.

Utilizando el sistema descrito se realizó la amplificación de los sRNAs seleccionados a partir de muestras de RNA total y polisomal (aislado por TRAP). Los productos de amplificación obtenidos fueron evaluados mediante separación en geles agarosa y curvas de *melting*. A modo de ejemplo se presentan las curvas de *melting* de los productos de amplificación de miR160 y miR169 (Figura 35A). La presencia de un único pico simétrico en las curvas de *melting* y la observación de una única banda en los geles de agarosa (dato no mostrado) sugiere la amplificación de un fragmento único. Con el fin de validar la especificidad de la amplificación por PCR, el producto de la reacción de sRNAs seleccionados se clonó en el vector *pGEM-T-Easy*, se transformaron bacterias y se tomaron dos colonias para la secuenciación de los plásmidos. Para ambas

colonias se obtuvieron lecturas correspondientes al sRNA esperado en cada uno de los casos (Anexo I). Para analizar la relación entre el ciclo umbral de detección (Ct) y la cantidad de RNA en la reacción, se realizaron ampliificaciones con distintas concentraciones de RNA inicial. Las curvas de amplificación obtenidas para miR160 y miR169 se presentan en la Figura 35B. A partir de las curvas se calculó el Ct y se graficó en función del logaritmo de la concentración de RNA, obteniendo en ambos casos coeficientes de regresión lineal ( $r^2$ ) superiores a 0,99 (Figuras 35B y C). Para los otros sRNAs analizados en este estudio se obtuvieron  $r^2$  superiores a 0,96 (datos no mostrados). Estos resultados indican que el sistema miScript permite cuantificar con alta sensibilidad los niveles de los sRNAs seleccionados a partir de muestras de RNA de plantas.



**Figura 35. Cuantificación de miRNAs mediante RT-qPCR utilizando el sistema miScript.** A. Curvas de *melting* de los productos de amplificación correspondientes a miR160 y miR169. B. Curvas de amplificación de qPCR para miR160 y miR169 utilizando diferentes concentraciones iniciales de RNA: 1, 3 ng, 2, 1 ng, 3 0,333 ng, 4 0,111 ng y 5 0,037 ng en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las reacciones se realizaron por duplicado. C. Regresiones lineales entre el ciclo de umbral de detección y el logaritmo de la concentración de RNA para las ampliificaciones de miR160 y miR169. Se muestran los coeficientes de regresión lineal  $r^2$  obtenidos. RFU indica unidades relativas de fluorescencia.

Utilizando esta metodología se cuantificaron sRNAs individuales tanto en muestras de RNA total como en RNA polisomal TRAP. En la Tabla 5 se muestran los sRNAs seleccionados, sus mRNAs blanco y la proporción de sRNA asociada a polisomas, calculada como la relación entre la abundancia relativa en el RNA polisomal y la abundancia en el RNA total de raíces no inoculadas. Es de destacar que la mayoría de los sRNAs presentan una proporción de asociación a polisomas relativamente baja (0,01-0,16), a excepción de los miR172, miR2609 y miR169, cuyas proporciones de asociación a polisomas fueron de 0,42, 0,27 y 0,20, respectivamente. Este resultado indica que existe una fuerte variabilidad en la proporción de sRNAs presente en la fracción de polisomas, lo que podría estar relacionado con su modo de acción y su posible rol en la regulación de la traducción de los genes blanco. Esta variabilidad podría relacionarse también con el grado de asociación a polisomas de sus mRNAs blanco.

**Tabla 5.** sRNAs de *M. truncatula* seleccionados y su grado de asociación a polisomas.

sRNA	Longitud (nt)	TRAP/TOTAL <sup>a</sup>	Familia génica blanco	Referencia
miR160	21	0,07	ARF8/16/17	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
miR166	21	0,01	HD-Zip class III	(Boualem <i>et al.</i> , 2008)
miR167	21	0,05	ARF2/3/4	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
miR169	21	0,20	HAP2/NF-YA	(Combier <i>et al.</i> , 2006)
miR171	21	0,02	GRAS TF <sup>b</sup> (NSP2)	(Devers <i>et al.</i> , 2011)
miR172	21	0,42	AP2 TF <sup>b</sup>	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
miR390	21	0,02	TAS3	(Jagadeeswaran <i>et al.</i> , 2009)
miR396	21	0,02	GRF1/2/4 <sup>c</sup>	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
miR1509	22	0,16	Posible TF <sup>b</sup>	(Zhai <i>et al.</i> , 2011)
miR2118	22	0,05	NBS-LRRs	(Zhai <i>et al.</i> , 2011)
miR2609	21	0,27	Proteínas de resistencia a enfermedad	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
tasiARFs	21	0,02	ARF2/3/4	(Zhai <i>et al.</i> , 2011)

<sup>a</sup> La relación de TRAP/TOTAL fue calculada dividiendo las abundancias normalizadas de cada sRNA en muestras TRAP y total.

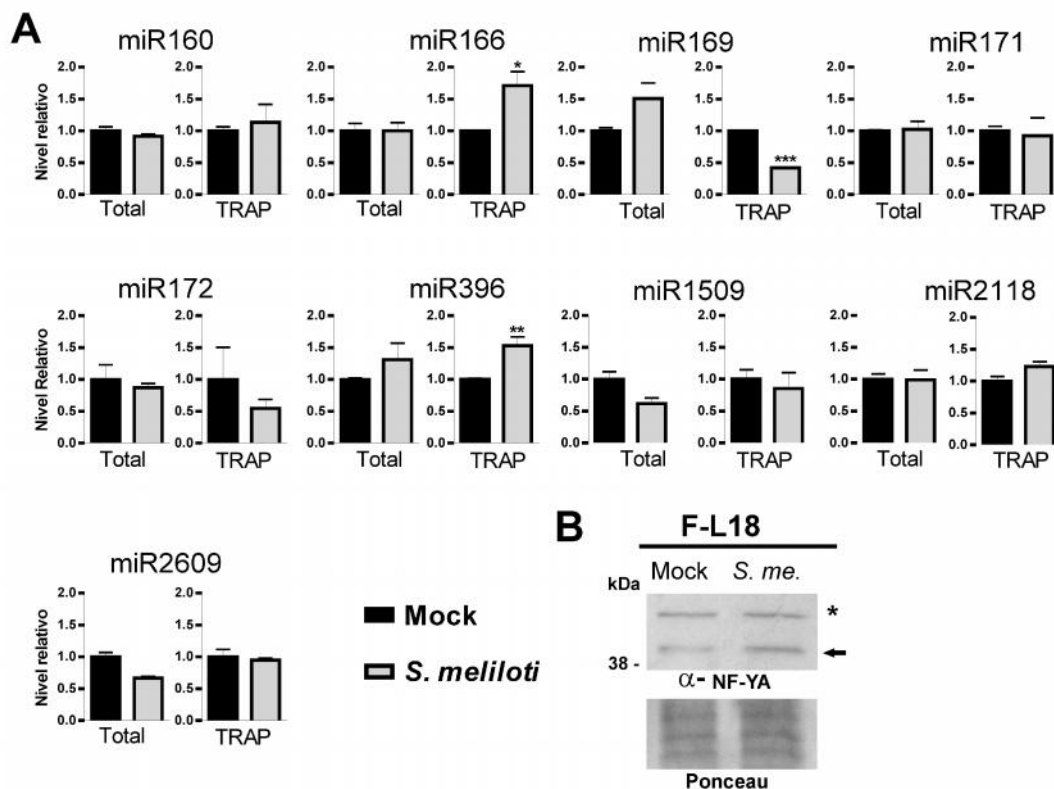
<sup>b</sup> Factores de transcripción (TF)

<sup>c</sup> TF del tipo GRF por *Growth Regulating Factors*

Para evaluar si existen cambios en los niveles de asociación a polisomas de los sRNAs durante la simbiosis, se cuantificaron los niveles de cada sRNA en RNA total y polisomal TRAP de raíces luego de 48 horas de la inoculación con *S. meliloti* o con

agua como control (Mock; Figura 36A). En las muestras de RNA total, la mayoría de los sRNAs no mostraron cambios significativos en la abundancia relativa, al menos al tiempo post-inoculación analizado en este trabajo. Las excepciones fueron miR1509 y miR2609, con una reducción de 40 % y 35 %, respectivamente. En las muestras de RNA TRAP, los niveles de miR166 y miR396 se incrementaron 1,7 y 1,5 veces en muestras inoculadas respecto a las inoculadas con agua. Dado que el grado de asociación a polisomas resultó muy bajo para ambos miRNAs (ver Tabla 5), no se profundizó su estudio. Por otra parte, miR169 mostró una disminución significativa (~60 %) en las muestras de TRAP de raíces inoculadas con *S. meliloti* respecto de las inoculadas con agua, sin embargo sus niveles no variaron significativamente en las muestras de RNA total. Este resultado sugiere que una fracción significativa de miR169 se disocia de los complejos polisómicos en respuesta a la infección rizobiana. Es interesante notar que el mRNA blanco *NF-YA1* contiene 2 sitios de unión a miR169 localizados en la región 3' UTR (Combiere *et al.*, 2006), una característica común de los miRNAs que actúan a nivel de la regulación traduccional en animales (Bartel 2009). A pesar de que experimentos de 5' RACE y degradoma han mostrado que *NF-YA1* es clivado en el primer sitio de reconocimiento de miR169 (Devers *et al.*, 2011), los resultados presentados en el Capítulo II (Figura 20) revelaron que *NF-YA1* estaría sujeto a una regulación positiva a nivel traduccional luego de la inoculación con *S. meliloti*. Esto nos llevó a evaluar los cambios en los niveles de la proteína NF-YA1 en la interacción simbiótica. Ensayos de *Western blot* revelaron que NF-YA1 se acumulaba a mayores niveles (~35 %) en las raíces inoculadas con *S. meliloti* que en aquellas inoculadas con agua (Figura 36B). El hecho de que la abundancia de miR169 disminuya en respuesta al rizobio en las muestras TRAP sugiere que miR169, además de actuar por un mecanismo de clivaje del mRNA blanco, podría contribuir a la represión traduccional de *NF-YA1* observada en etapas previas a la inoculación.





**Figura 36. Cambios en la asociación de sRNAs a polisomas en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.** **A.** Niveles de sRNA analizados por RT-qPCR en RNA total y polisomal TRAP obtenidos a partir de raíces inoculadas con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras) luego de 48 horas de tratamiento. Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcripto *HIS3L* y están expresados relativos a la condición control. Los asteriscos indican que los valores de las muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras Mock en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $0,01 < P < 0,05$  (\*),  $0,001 < P < 0,01$  (\*\*) y  $0,001 > P$  (\*\*\*). Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes. **B.** Western blot utilizando anticuerpos contra NF-YA1 ( $\alpha$ -NF-YA) a partir de raíces transformadas con 35S:FLAG-RPL18 (F-L18) luego de 48 horas de la inoculación con *S. meliloti* (*S. me.*) o agua como control (Mock). El panel inferior muestra la tinción de la membrana por Ponceau. La flecha indica la posición de la proteína NF-YA1 y el asterisco indica una banda no específica. La masa molecular del marcador se indica a la izquierda en kDa.

Uno de los miRNAs seleccionados en este estudio fue miR390, el cual activa la producción de tasiARFs por el clivaje del transcripto no codificante *TAS3*. La cuantificación de sus niveles luego de la inoculación mostró una disminución cercana al 70 % en RNA total y un incremento del 30 % en polisomas TRAP de raíces inoculadas con respecto a la condición Mock (Figura 37A). Concomitante con la disminución a nivel de RNA total, su mRNA blanco *TAS3* presenta un pequeño aumento en la muestra de RNA total, sin que se observen variaciones en la fracción asociada a polisomas. La acción de miR390 sobre el transcripto no codificante *TAS3* produce tasiARFs, (*trans-acting small interference RNAs*) que actúan regulando los niveles de los mRNA de los factores de respuesta a auxina *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Los niveles de tasiARFs presentaron una reducción de aproximadamente un 40 % en el RNA total de raíces

inoculadas respecto de aquellas tratadas con agua. Consistentemente, los mRNAs *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* aumentaron sus niveles en RNA total en respuesta al rizobio (Figura 37B), mientras que en las muestras TRAP se observó un incremento significativo en los niveles de transcripto sólo para el caso de *ARF2*.

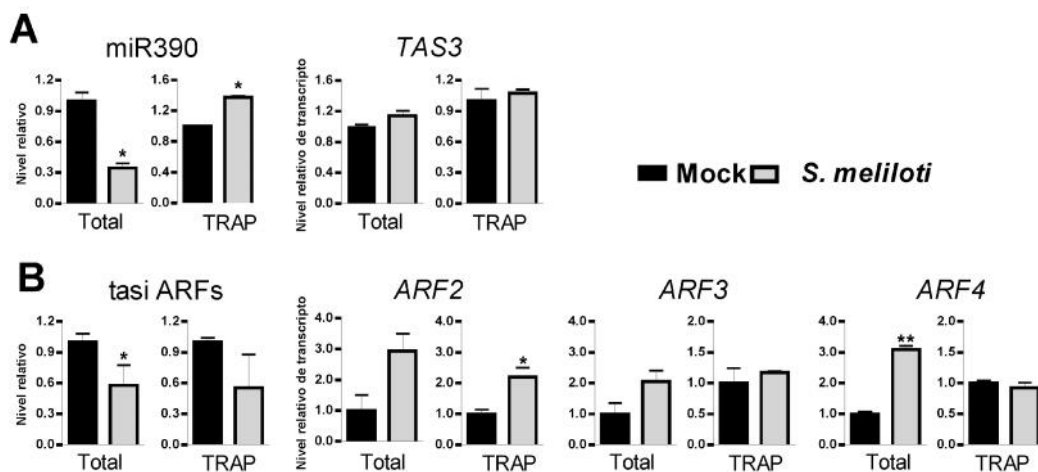


Figura 37. Niveles relativos de sRNAs y transcritos de la vía de los tasiARFs en RNA total y polisomal TRAP en raíces inoculadas y control. A. Niveles relativos de miR390 y su transcripto blanco *TAS3*. B. Niveles relativos de tasiARFs, y de sus transcritos blanco *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Los niveles de sRNAs y mRNAs fueron analizados por RT-qPCR en RNA total y polisomal TRAP a partir de raíces inoculadas con *S. meliloti* (barras grises) o con agua como control (Mock, barras negras) luego de 48 horas del tratamiento. Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcripto *HIS3L* y están expresados relativos a la condición control. Los asteriscos indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras control en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $0,01 < P < 0,05$  (\*) y  $0,001 < P < 0,01$  (\*\*).

Los resultados presentados indican una relación entre la vía regulatoria iniciada por miR390 y la respuesta al rizobio, por lo cual se decidió evaluar si miR390 y los tasiARFs podrían cumplir alguna función en la formación de nódulos en la asociación simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti*. Estudios previos llevados a cabo en *Arabidopsis* mostraron que miR390 se expresa principalmente en los sitios de iniciación de las raíces laterales, donde dispara la producción de tasiARFs y la represión de la expresión de sus blancos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, promoviendo así el crecimiento de las raíces laterales (Marin *et al.*, 2010). Con el objetivo de evaluar el efecto de miR390 sobre la nodulación y el crecimiento de las raíces laterales en *M. truncatula* se utilizó una estrategia de sobreexpresión del precursor de miR390. En el genoma de *M. truncatula* se identificaron dos genes que codifican para miR390, los cuales se denominaron miR390a y miR390b. El análisis de la secuencia indica que ambos genes producirían el mismo miRNA maduro, por lo que se seleccionó el miR390b para su sobreexpresión. La región de T-DNA del vector vacío se denominó 35S:GAT, mientras

que la que contiene el precursor de miR390b (pre-miR390b) bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S se denominó 35S:miR390b (Figura 38). Además el vector posee el gen *nptII* que permite la selección de las raíces mediante crecimiento en un medio con kanamicina y el gen de la proteína verde fluorescente GFP bajo el promotor del gen *rolD*, lo que permite distinguir las raíces transgénicas fluorescentes de aquellas no-transgénicas bajo luz UV.

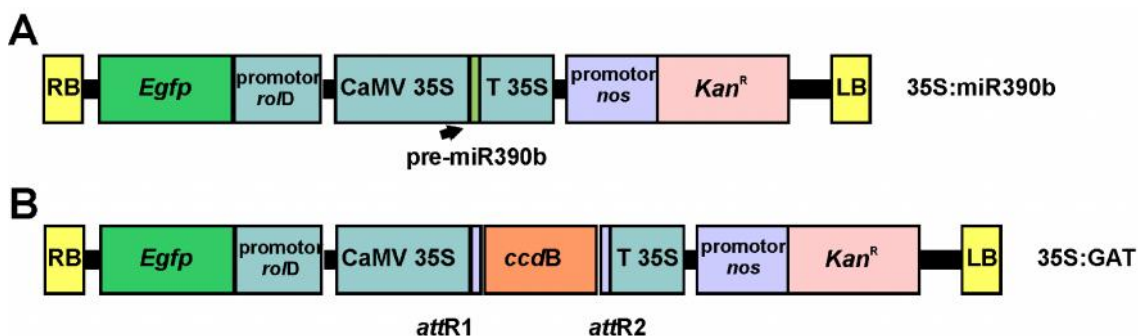


Figura 38. Esquema del T-DNA del vector utilizado para sobreexpresar el precursor pre-miR390b (A) y del vector control pK7WG2D (35S:GAT; B). Se muestran las secuencias de los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA, el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV 35S) y su terminador (T 35S); el gen que confiere la resistencia a kanamicina ( $Kan^R$ ) *nptII* bajo el control del promotor de la nopalina sintasa (nos) de *A. tumefaciens* y el gen que codifica la proteína verde fluorescente *Egfp* bajo el control del promotor *rolD* de *A. tumefaciens*. También se indican las regiones *attR1* y *attR2* de recombinación sitio específica del sistema GATEWAY y el gen *ccdB*, que inhibe la DNA girasa de *Escherichia coli*.

Las construcciones 35S:GAT y 35S:miR390b fueron introducidas en raíces de *M. truncatula* mediante transformación mediada por *A. rhizogenes* y se cuantificaron los niveles de miR390 en las raíces transgénicas. La sobreexpresión resultó en un incremento de 2,3 veces en las raíces 35S:miR390b respecto de las raíces transformadas con el vector vacío 35S:GAT (Figura 39).

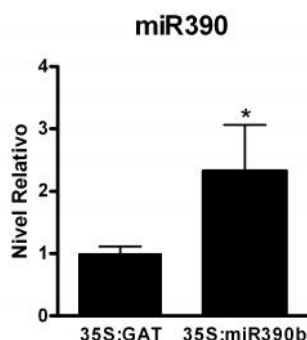
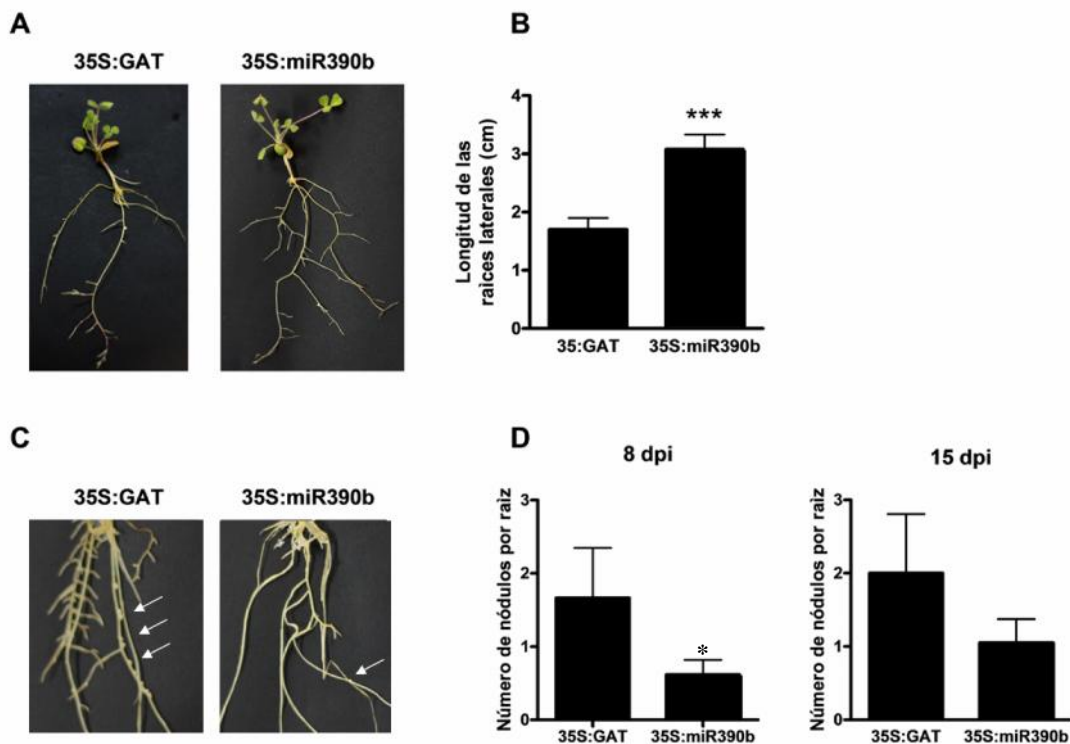


Figura 39. Sobreexpresión del precursor de miR390. Los niveles de miR390 fueron cuantificados por RT-qPCR en RNA total de raíces transformadas con 35S:GAT (barras negras) y 35S:miR390b (barras blancas). Los datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas técnicas normalizadas por el nivel del transcrito *HIS3L*, y se expresan en relación a los niveles normalizados en raíces 35S:GAT. El asterisco indica que los valores de las muestras son significativamente diferentes en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $P < 0,1$  (\*).

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de *TAS3* afectó la longitud de las raíces laterales en *Arabidopsis* (Marin *et al.*, 2010), se cuantificó su longitud en las plantas compuestas que llevan la construcción 35S:miR390b o 35S:GAT. Como se ilustra en la Figura 40A, las plantas que sobreexpresan pre-miR390b presentaron raíces

laterales con una longitud promedio 80 % superior a las desarrolladas en las plantas 35S:GAT (Figura 40B).



**Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de pre-miR390b en la formación de raíces laterales y nódulos.** A. Fotos de una planta control 35S:GAT y una 35S:miR390b ilustrando el mayor crecimiento de las raíces laterales en las plantas 35S:miR390b. B. La longitud de las raíces laterales fue cuantificada en plantas compuestas de 4 semanas. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. Los datos corresponden a una réplica biológica en cada caso con más de 30 raíces analizadas para cada construcción. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $P < 0,001$  (\*\*\*). C. Fotos de las raíces de una planta 35S:GAT y una 35S:miR390b ilustrando el menor número de nódulos desarrollados en las raíces que sobreexpresan pre-miR390b. Las flechas señalan la presencia de nódulos. D. El número de nódulos por raíz formados en plantas compuestas fue evaluado a los 8 días y 15 días luego de la inoculación con *S. meliloti*. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $P < 0,1$  (\*).

También se analizó el efecto de la sobreexpresión de miR390 sobre la capacidad de formar nódulos luego de la inoculación con *S. meliloti*. Se observó una disminución en la cantidad de nódulos formados en plantas que sobreexpresan pre-miR390b con respecto a las plantas 35S:GAT al cabo de 8 y 15 dpi con *S. meliloti* (Figura 40C y D). Además, un 20 % de las plantas 35S:miR390b no formaron nódulos, mientras que esto sucedió solamente en el 10 % las plantas 35S:GAT. Este ensayo sugiere que el miR390 regularía negativamente la formación de nódulos en *M. truncatula*. Sin embargo, cabe destacar que los resultados mostrados corresponden a una sola réplica biológica y se requieren datos provenientes de ensayos independientes para respaldar esta conclusión.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que los sRNAs, incluyendo miRNAs de 21 y 22 nts y tasiRNAs, se asocian a complejos traduccionales en forma dinámica, modificándose su grado de asociación en respuesta a la formación de nódulos. Estos cambios se podrían correlacionar con cambios en el estado traduccional de los mRNAs blanco. El caso particular de miR169 y *NF-YA1* sería un ejemplo de este tipo de regulación. Por otro lado, se encontró que la abundancia de miR390 disminuye significativamente en las muestras de RNA total en respuesta a la inoculación, y esto se ve acompañado de una disminución de los niveles de tasiARFs y un incremento significativo de los mRNAs *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Por último, ensayos preliminares mostraron que la sobreexpresión de pre-miR390b ejercería un efecto positivo sobre el crecimiento de las raíces laterales, pero afectaría negativamente la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*.

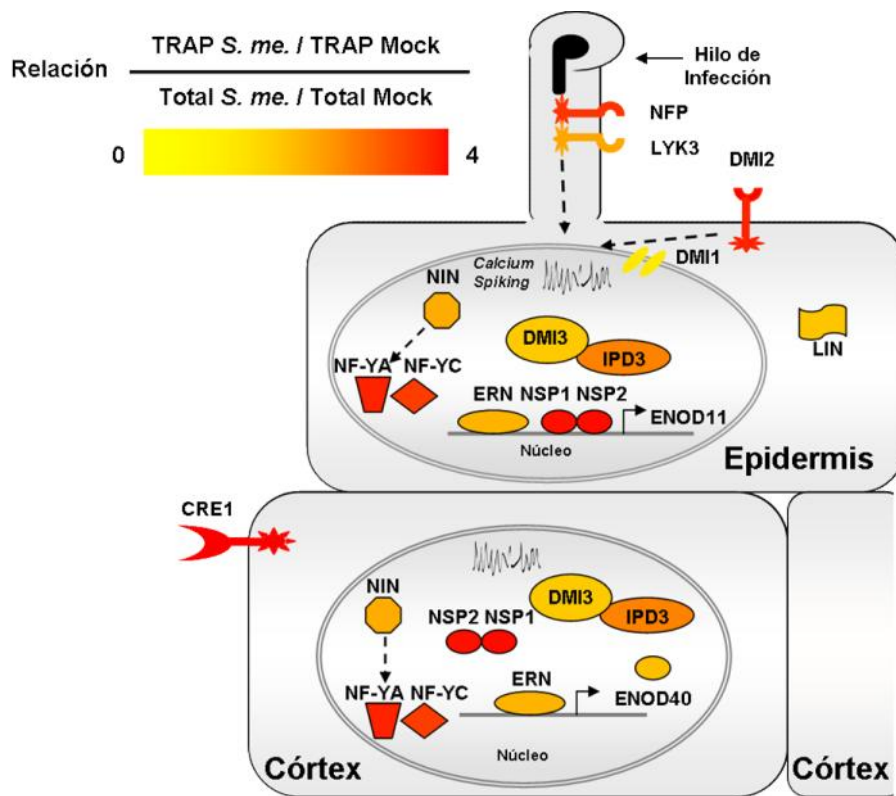
## Discusión

### 1. Reclutamiento selectivo de transcriptos a complejos traduccionales en respuesta a la inoculación

La traducción de mRNAs es un proceso que contribuye significativamente a coordinar y modular la expresión génica durante el desarrollo o la adaptación de las plantas a condiciones ambientales variables (Bailey-Serres *et al.*, 2009). La estabilidad de los mRNAs y la eficiencia de su traducción es regulada también por la acción de sRNAs regulatorios, los cuales poseen funciones claves durante diversos procesos biológicos (Voinnet 2009). En el presente trabajo de tesis planteamos como hipótesis que el nivel de regulación traduccional contribuye significativamente a los cambios en la expresión génica que tienen lugar durante las etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno y a su vez que cada tipo celular de la raíz contribuye diferencialmente a estos cambios. Asimismo se consideró que los sRNAs podrían tener un rol regulatorio de la traducción durante la simbiosis. Para contrastar dichas hipótesis y obtener evidencias de la importancia de la regulación traduccional durante este proceso asociativo, se caracterizaron los cambios en los mRNAs y sRNAs asociados a la maquinaria traduccional en respuesta a la inoculación con rizobio. Para ello se aplicó la técnica de TRAP (Zanetti *et al.*, 2005) a raíces de *M. truncatula*. Esta técnica permite la purificación por afinidad de ribosomas y polisomas que llevan una proteína ribosomal fusionada a un epítopo FLAG.

Como paso previo a la caracterización de mRNAs y sRNAs individuales, se evaluó el efecto de la infección con *S. meliloti* sobre los niveles globales de transcriptos asociados a los ribosomas y polisomas. La inoculación con *S. meliloti* no modificó significativamente los perfiles de polisomas de raíces de *M. truncatula*, al menos al tiempo evaluado en este estudio (48 horas luego de la inoculación con rizobio). Este mismo comportamiento se observó durante etapas tempranas de las interacciones planta – patógeno como la infección de cebada por el hongo biotrófico *Blumeria graminis* o la de *Arabidopsis* por el virus del mosaico del nabo (Moeller *et al.*, 2012). Sin embargo, en cada caso fue posible detectar transcriptos que cambian su asociación a los polisomas a nivel individual.

Utilizando la técnica de TRAP se caracterizaron los cambios en la asociación a polisomas de mRNAs involucrados en las vías de señalización de la nodulación al tiempo en el cual se produce la activación de las divisiones corticales y la formación de los hilos de infección. Posteriormente, estos resultados fueron validados utilizando la purificación convencional de polisomas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Los resultados obtenidos mostraron que la traducción selectiva de mRNAs contribuiría a la regulación de la expresión génica en un estadio temprano de la simbiosis. En la Figura 41 se presenta un esquema que resume la regulación traduccional de los distintos transcritos analizados utilizando una escala de colores. Estos datos reflejan la regulación traduccional en la raíz completa y fueron graficados en los distintos tipos celulares en base a la vía de señalización de la nodulación propuesta a partir de datos bibliográficos (revisado en Oldroyd *et al.*, 2011).



**Figura 41. Regulación traduccional de genes involucrados en la vía de señalización de la nodulación.** Se muestran los genes para los que se calculó la relación traduccional basada en la variación a nivel de TRAP en relación a la variación a nivel de RNA total en respuesta a las condiciones de inoculación. Este valor se grafica como un gradiente de color desde el valor 0 indicado con amarillo y 4 con rojo. Se indica con una flecha la progresión del hilo de infección (IT).

A partir de este análisis se identificó un grupo de transcriptos que presentan modificaciones pequeñas o nulas a nivel de su abundancia celular pero que son regulados positivamente a nivel traduccional en respuesta a *S. meliloti*. Este resultado implicaría que los mRNAs se encuentran secuestrados en RNPs traduccionalmente inactivos en condiciones sin inoculación y luego de la inoculación son reclutados a la maquinaria traduccional. Los mRNAs de este grupo cumplen roles importantes en la interacción ya que son requeridos para la infección bacteriana o la organogénesis del nódulo. Este grupo incluyó los genes que codifican los RLKs NFP, DMI2 y CRE1 y los factores de transcripción NF-YA1, NF-YC1, NSP1 y NSP2. Un reporte previo mostró que los transcriptos de *NF-YA1* se acumulan (entre 2 y 5 veces) en raíces a tiempos tempranos luego de la inoculación con *S. meliloti* 2011 o luego del tratamiento con factor Nod purificado (Moreau *et al.*, 2011). Sin embargo, en los ensayos realizados en esta tesis no se detectaron cambios en la abundancia de mRNAs de *NF-YA1* en las muestras de RNA total en respuesta a la inoculación con rizobio. Esta discrepancia podría ser explicada por las diferencias en las condiciones de crecimiento o edad de las plantas, el uso de una cepa diferente de rizobio (*S. meliloti* 1021) o una cantidad diferente de inóculo. Es interesante notar la fuerte coordinación en la regulación traduccional observada para los genes *NSP1* y *NSP2*, cuyos productos forman un heterodímero capaz de unirse y activar la expresión del promotor *ENOD11* en raíces de *M. truncatula* (Hirsch *et al.*, 2009). Esta regulación traduccional coordinada también se detectó para los genes que codifican las subunidades NF-YA y NF-YC, las cuales podrían formar parte del mismo complejo transcripcional. Si bien los promotores que unen directamente al complejo NF-Y no han sido caracterizados en plantas leguminosas, estos complejos regulan directa o indirectamente la expresión de genes que participan en la transición de la fase G2 a M del ciclo celular, promoviendo la activación de las divisiones celulares en el córtex y en el periciclo (Zanetti *et al.*, 2010, Soyano *et al.*, 2013).

Un segundo grupo de genes, formado por *NIN*, *ERN1* y *ENOD40*, exhibió incrementos similares en cuanto a su abundancia en el RNA total y en su asociación polisomas en respuesta al rizobio. Este resultado sugiere que los tres genes presentarían una respuesta transcripcional y traduccional coordinada durante la formación del nódulo. Estos transcriptos serían exportados al citoplasma donde, luego de pasar los controles de calidad, son rápidamente reclutados en polisomas. Sólo el gen *DMII* fue



clasificado como regulado negativamente a nivel traduccional. Si bien sus transcriptos se acumularon a mayores niveles en raíces inoculadas con rizobio respecto de aquellas inoculadas con agua, se observó una disminución de los niveles de asociación a polisomas. Este resultado sustenta la idea de que los incrementos en la abundancia de los transcriptos en respuesta a un estímulo ambiental no necesariamente se correlacionan con un incremento en la síntesis de la proteína codificada. Este tipo de regulación traduccional fue reportada previamente para un grupo de genes en plántulas de *Arabidopsis* privadas de oxígeno por períodos cortos o bien en respuesta al tratamiento con giberilinas (Branco-Price *et al.*, 2008, Ribeiro *et al.*, 2012). Por otro lado, los genes *DMI3* e *IPD3*, cuyos productos interactúan físicamente en el núcleo de las células de la raíz de *M. truncatula* (Messinese *et al.*, 2007), no fueron regulados a nivel transcripcional o traduccional al menos a las 48 hpi con *S. meliloti*. El mismo comportamiento se observó para los genes *LIN* y *LYK3*. Sin embargo, todos los transcriptos analizados en este trabajo mostraron niveles detectables en las fracciones de polisomas tanto en condiciones de inoculación con rizobio o tratamiento con agua. Este resultado es consistente con su rol en la percepción del rizobio y la señalización requerida para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

Es de destacar que tres de los receptores requeridos para la nodulación se encuentran regulados positivamente a nivel traduccional. Ha sido propuesto que luego de la percepción de la señal, los receptores podrían ser internalizados y degradados por la vía de la ubiquitina-proteasoma (Oldroyd *et al.*, 2011) y por lo tanto estarían sometidos a una reposición activa. La percepción del factor Nod es requerida no sólo para los eventos iniciales de enrulamiento del pelo y formación del foco de infección, sino también para la progresión del hilo de infección hacia el primordio del nódulo (Arrighi *et al.*, 2006). En este contexto, el receptor del factor Nod podría ser sintetizado *de novo* durante el progreso de la infección, resultando entonces en una mayor asociación de los mRNAs de *NFP* a polisomas en raíces inoculadas. El grupo de transcriptos que incrementa su nivel de asociación a polisomas incluye, como se mencionó, también a cuatro mRNAs que codifican factores de transcripción. En mamíferos se encontró que los niveles de la subunidad NF-YA del factor de transcripción heterotrimérico NF-Y es modulada por la vía de la ubiquitina-proteasoma, influenciando la proliferación celular (Manni *et al.*, 2008). Por su parte, en plantas podrían existir mecanismos altamente regulados de síntesis y degradación de proteínas

que modulen la abundancia y función de los receptores y factores de transcripción durante la infección bacteriana y/o el desarrollo del nódulo. El hecho de que las ligasas de ubiquitina LIN y nsRING en *L. japonicus* son requeridas para la infección bacteriana (Shimomura *et al.*, 2006, Kiss *et al.*, 2009), sugiere que la ubiquitinación podría ser la vía de degradación para los componentes de la cascada de señalización. Este análisis resalta el posible rol de la regulación traduccional como mecanismo necesario para el progreso de la simbiosis.

## **2. Análisis de transcritos asociados a complejos traduccionales de tipos celulares específicos de la raíz en respuesta a la inoculación**

Otro de los objetivos de la presente tesis consistió en caracterizar la asociación de mRNAs a ribosomas a nivel de los distintos tipos celulares involucrados en las etapas tempranas de la simbiosis. La formación de un nódulo funcional depende por un lado, de la activación de las divisiones celulares en el córtex y el periciclo para formar el primordio nodular y por otro de la infección bacteriana que ocurre en la epidermis (Oldroyd *et al.*, 2011). Por otra parte, el floema transporta los productos fotosintéticos y otros metabolitos requeridos para el desarrollo del nódulo, y existen evidencias del establecimiento de una continuidad simplásmica entre el floema y otras células de la raíz que precede las divisiones corticales durante la formación del nódulo (Complainville *et al.*, 2003). Para evaluar la expresión en las células involucradas en la formación del nódulo se utilizó la técnica de TRAP a partir de tejido expresando FLAG-RPL18 bajo promotores que activan la transcripción en tipos celulares específicos de la raíz. Se utilizaron promotores derivados de *Arabidopsis* y *M. truncatula*, que dirigen la expresión de FLAG-RPL18 a epidermis, córtex y tejido vascular de las raíces de *M. truncatula*.

El análisis incluyó seis transcritos de la vía de señalización de nodulación que presentaron evidencias de regulación traduccional positiva a nivel de raíz completa verificándose el incremento diferencial en respuesta al rizobio en muestras TRAP de plantas transformadas con 35S:FLAG-RPL18 en comparación con muestras totales. Se encontró que los mRNAs seleccionados se asocian diferencialmente a polisomas de los epidermis, córtex y tejido vascular verificando la especificidad de la purificación. Para el receptor DMI2 se obtuvo la mayor acumulación de transcritos asociados a ribosomas en muestras de células epidérmicas luego de la inoculación. Este resultado

está de acuerdo con las evidencias reportadas mediante ensayos de fusión de promotor a *GUS* para este gen, y con la función propuesta para este receptor en la percepción de una señal necesaria en las etapas iniciales de la interacción (Bersoult *et al.*, 2005). Para *NF-YAI* se encontraron los mayores niveles de transcritos asociados a ribosomas en células epidérmicas. Si bien ha sido reportado que *NF-YAI* se expresa en la región meristemática del nódulo (Combiér *et al.*, 2006), un estudio reciente reveló que los transcritos de *NF-YAI* se acumulan en las células de la zona de infección del nódulo (Limpens *et al.*, 2013). Estos antecedentes podrían correlacionarse con el incremento de *NF-YAI* en células de la epidermis y del floema a etapas tempranas de la inoculación con rizobio. Por otro lado, *NF-YCI* mostró un incremento en los mismos tipos celulares, mientras que en células corticales *NF-YCI* permaneció sin cambios en respuesta a la inoculación. La presencia de transcritos de las subunidades *NF-YAI* y *NF-YCI* asociados a los complejos traduccionales en los mismos tipos celulares sería un indicativo de que su traducción ocurre en las mismas células. Esto plantea la posibilidad de que las proteínas codificadas puedan actuar en conjunto como reguladores de la expresión génica en los tipos celulares analizados.

*NSP1* y *NSP2* mostraron un aumento en su asociación a ribosomas en respuesta a la inoculación en raíces completas. Sin embargo, se observó una disminución en la asociación a ribosomas de los dos transcritos en células del floema. Esta disminución fue acompañada por un incremento de *NSP1* en las células corticales. Este resultado sugiere que los niveles de asociación a polisomas de *NSP1* son regulados en forma opuesta en córtex y floema. Sin embargo, es posible especular también que los transcritos de *NSP1* podrían movilizarse desde el floema hacia las células del córtex durante el establecimiento de la simbiosis. El movimiento intercelular de mRNAs desde el floema hacia otros tipos celulares ha sido reportado previamente para genes que codifican factores de transcripción en *Arabidopsis* y tomate (Jackson and Hong 2012). En el caso de *NSP2*, si bien presentó una regulación transcripcional positiva en la raíz completa, no se detectaron incrementos en los niveles de transcritos asociados a polisomas en las células del córtex, del floema o en la epidermis. Este resultado plantea la posibilidad de que el incremento en la asociación a ribosomas ocurra mayoritariamente en tejidos de raíz que no fueron analizados en este trabajo.

Por otra parte, los transcritos *ENOD40* y *CRE1* presentaron una regulación traduccional positiva en el córtex, en donde participan en la activación de las divisiones celulares que dan lugar al primordio nodular. Estos resultados coinciden con los

patrones reportados mediante ensayos de activación transcripcional guiada por el promotor de cada gen donde se observó la expresión de GUS en las células corticales contiguas al sitio de infección (Fang and Hirsch 1998, Lohar *et al.*, 2006). Sin embargo, cabe mencionar que los niveles relativos de asociación a polisomas para ambos transcritos resultaron mayores en floema o epidermis que en córtex en las raíces no inoculadas.

Es importante destacar que los ensayos de actividad de promotor no son representativos de la estabilidad del transcrito ni de su asociación a ribosomas, por lo que no necesariamente pueden correlacionarse con los datos obtenidos mediante TRAP. Además, otra posible explicación para estas diferencias puede encontrarse en el patrón de expresión de pCO<sub>2</sub> obtenido mediante la expresión de la proteína de fusión GFP-RPL18. En estos ensayos se observó que los niveles mayoritarios de fluorescencia se encontraban en células del córtex de la región meristemática. Sin embargo, la detección disminuía hacia la región de elongación de la raíz. Este patrón de expresión podría explicar los bajos niveles de detección para varios de los transcritos en muestras de TRAP dirigidas por pCO<sub>2</sub>. Una alternativa es el uso de la construcción PEP:FLAG-RPL18, cuyo promotor activa la transcripción en células corticales de la región de elongación de la raíz en *Arabidopsis*. Esta zona corresponde a la región susceptible de infección por rizobios en leguminosas, ya que presenta pelos en crecimiento activo. Esta alternativa puede permitir mejorar la detección de los transcritos de córtex, ya que se obtendrán datos más representativos de las células corticales que se encuentran en sitios de infección. Por otro lado, el bajo rendimiento obtenido en muestras de TRAP de células corticales o de epidermis puede dificultar la cuantificación de transcritos poco abundantes. No obstante, la cuantificación de los transcritos analizados mostró que existen comportamientos diferentes para un mismo transcrito dependiendo del tipo celular examinado. Esto abre la posibilidad de extender esta aproximación experimental a otros tipos celulares para la construcción de un mapa espacial que permita visualizar los cambios en la expresión génica en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

### 3. Análisis de sRNAs asociados a complejos traduccionales

#### 3.1. Niveles de asociación de sRNAs a polisomas y su posible mecanismo de acción

En base a las evidencias reportadas previamente sobre la regulación a nivel traduccional mediada por sRNAs, en este trabajo se investigó la asociación de miRNAs y siRNAs a la maquinaria traduccional en raíces de *M. truncatula* y los cambios en dicha asociación en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Once miRNAs y un tasiARF se encontraron asociados a las muestras de ribosomas obtenidos mediante la purificación por TRAP, dando sustento a la noción de que los sRNAs pueden actuar a nivel de la represión traduccional en plantas. Los porcentajes de asociación a polisomas fueron variables para cada sRNA, pero dentro de un rango comparable a lo reportado previamente en polisomas de plántulas de *Arabidopsis* obtenidos mediante purificación convencional (Lanet *et al.*, 2009). El porcentaje de asociación de miRNAs a polisomas puede estar influenciado por la abundancia y el grado de asociación a polisomas de su mRNA blanco, así como por la interacción con RBPs. También podría reflejar la contribución relativa de los mecanismos de represión traduccional de cada miRNA. Estudios en sistemas animales mostraron que la represión traduccional podría ocurrir en la etapa de la iniciación o re-iniciación de la traducción o bien en las etapas post-iniciación (elongación y/o terminación). Los mecanismos que reprimen la etapa de iniciación o post-iniciación afectarían el ensamblado del complejo de iniciación, mientras que los mecanismos de represión post-iniciación podrían involucrar la reducción de la elongación o la disociación temprana de los ribosomas (Fabian *et al.*, 2010). Un estudio reciente llevado a cabo en células humanas indica que la regulación de la traducción por miRNAs se ejercería a través de la interrupción de la función del complejo eIF4F (Meijer *et al.*, 2013). En particular, este estudio reveló que la helicasa eIF4A2, que forma parte del eIF4F, y la presencia de regiones 5' UTR altamente estructuradas son requeridas para la represión traduccional. Además, se encontró que la mayor parte de los mRNAs que contienen sitios de unión a miRNAs en su 3'UTR poseen 5'UTR más estructurados. En plantas, aún se desconoce el mecanismo por el cual los miRNAs ejercen la regulación traduccional de sus mRNAs blanco. No obstante, las evidencias indicarían que este nivel de regulación tiene un rol importante en el desarrollo de las plantas. Se han descrito mutantes de *Arabidopsis* en que se encuentra

afectada la inhibición traduccional dirigida por miRNAs, pero no la actividad de clivaje de sus mRNAs blanco. Estos genes codifican una proteína que interviene en la dinámica de microtúbulos asociados a miRNAs, KATANIN, una proteína componente del complejo de *decapping*, VARICOSE y una proteína con repeticiones ricas en glicina y triptofano denominada SUO (Brodersen *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2012). Recientemente, se describió la mutante *amp1* (por *altered meristem program 1*) de Arabidopsis, afectada en la inhibición traduccional por miRNAs (Li *et al.*, 2013). *AMP1* codifica una proteína homóloga a una glutamato carboxipeptidasa humana. Esta proteína se asocia a AGO1 y se localiza en el retículo endoplásmico (Li *et al.*, 2013). Es de destacar que la mutante *TCO* de *L. japonicus*, que codifica una proteína homóloga a AMP1, presentó defectos en el desarrollo del nódulo y el mantenimiento del meristema apical (Suzaki *et al.*, 2013). Estas evidencias sustentarían la posibilidad de que la regulación a nivel traduccional tenga un rol en el desarrollo de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

### 3.2. Regulación de *NF-YA1* durante la nodulación

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el factor de transcripción *NF-YA1* es regulado positivamente a nivel traduccional en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Esto se vio acompañando de una mayor acumulación de la de la proteína *NF-YA1* en las raíces inoculadas. Por otro lado, miR169 tiene como blanco la familia de factores de transcripción *NF-YA*. Este miRNA mostró una importante disminución en sus niveles de asociación a polisomas en respuesta a la inoculación, mientras que sus niveles en muestras de RNA total no sufrieron modificaciones significativas. Este resultado sugiere que miR169 y los transcritos *NF-YA1* podrían estar sujetos a una distribución dinámica entre complejos traduccionalmente activos y otros complejos RNPs citoplasmáticos. Los *P bodies* contienen factores de degradación de mRNAs, represores traduccionales y mRNAs no traducidos (Balagopal and Parker 2009). Estos complejos podrían participar en el particionamiento dinámico de mRNAs y miRNAs entre los diferentes RNPs dentro del citoplasma celular. En animales, la proteína GW182 se encuentra localizada en *P bodies*, contiene repeticiones ricas en glicina y triptofano, y promueve la represión traduccional y degradación de mRNAs por medio de su interacción con proteínas Argonautas (Ding and Han 2007, Eulalio *et al.*, 2009). En Arabidopsis se identificó la proteína SUO, que colocaliza con la enzima DCP-1 de P

*bodies*. SUO participaría de la represión traduccional mediada por miRNAs (Yang *et al.*, 2012). Además Brodersen *et al.*, (2008) mostraron que VCS, otra proteína de *P bodies*, es requerida para el silenciamiento independiente del clivaje de mRNAs. En base a estos antecedentes, sería interesante evaluar si estas proteínas poseen un rol en el particionamiento del mRNA de *NF-YAI* y miR169 entre RNPs.

La regulación de la expresión de *NF-YAI* no puede ser atribuida únicamente a la acción propuesta de miR169. La expresión de *NF-YAI* se encuentra también regulada por un pequeño péptido codificado en la región 5' UTR de *NF-YAI* producido por *splicing* alternativo (Combier *et al.*, 2008). La forma alternativa del transcripto retiene un intrón de 865 nts y se acumula en raíces no inoculadas. La región retenida contiene tres uORFs que codifican tres péptidos pequeños. Estudios del traductoma de *Arabidopsis* mostraron que los transcriptos que presentan uORFs son traducidos a menor tasa que aquellos sin uORFs (Kawaguchi and Bailey-Serres 2005). Estas características podrían contribuir a la regulación de la traducción de *NF-YAI* en raíces sin inocular. Por otro lado, se ha establecido que miR169 restringe espacialmente la expresión de *NF-YAI* al meristema del nódulo mediante un mecanismo de clivaje (Combier *et al.*, 2006). Sin embargo, en raíces inoculadas se observó que existe un incremento de los niveles de proteína NF-YA1 sin cambios a nivel de la abundancia de su mRNA. Un modelo sobre el modo de acción de los miRNAs propone que los mismos podrían actuar a dos niveles: a nivel de la estabilidad del mRNA blanco y a nivel de su traducción (Voinnet 2009). Ambos niveles no necesariamente coinciden espacial y temporalmente. En el primer modo de acción los miRNAs actuarían mediante un mecanismo de clivaje del transcripto, lo que produciría cambios irreversibles requeridos para establecer los destinos celulares durante el desarrollo, como es el caso de meristemas. En el segundo mecanismo de acción, los miRNAs actuarían mediante la represión traduccional de su transcripto blanco de una manera reversible. Esto podría regular la diferenciación de tipos celulares, pero también contribuir a la coordinación y modulación de la expresión génica durante las respuestas a las condiciones ambientales. En este trabajo, se propone que la disminución de los niveles de miR169 en polisomas podría contribuir a la pérdida de represión traduccional del mRNA de *NF-YAI* en etapas tempranas luego de la inoculación con *S. meliloti*. En *Arabidopsis*, la infección por *Pseudomonas syringae* provoca cambios en el proteoma que preceden los cambios en el transcriptoma (Jones *et al.*, 2006). Un caso similar podría ser el de *NF-YAI*, ya que

estudios previos han mostrado un incremento en los niveles de transcripto de *NF-YA1* en tiempos posteriores al aquí estudiado (Combiere *et al.*, 2006, Moreau *et al.*, 2011). En este escenario es posible proponer un modelo de regulación post-transcripcional de *NF-YA1* que involucra diferentes niveles. En las raíces no inoculadas, una fracción de miR169 permanece unida al mRNA de *NF-YA1* asociado a polisomas, limitando su tasa de traducción. A tiempos tempranos luego de la inoculación (2 dpi), cuando comienzan a formarse los hilos de infección y se activan las divisiones corticales, el miR169 se disocia parcialmente de los polisomas, favoreciendo la iniciación/reiniciación de la traducción de *NF-YA1*. Esto se evidencia en los mayores niveles de asociación a polisomas del transcripto *NF-YA1* y los mayores niveles de proteína encontrados en las raíces inoculadas con *S. meliloti*. En una etapa posterior, cuando comienzan a diferenciarse las zonas de nódulo indeterminado (4-10 dpi), el miR169 opera en la zona de infección por un mecanismo de clivaje que restringe la acumulación de los transcriptos de *NF-YA1* a la zona meristemática, promoviendo el crecimiento del nódulo (Combiere *et al.*, 2006). En estadios más tardíos del desarrollo del nódulo (14 -28 dpi), el *splicing* alternativo de *NF-YA1* resulta en la expresión de un péptido pequeño codificado por el uORF1, que se une al mRNA *NF-YA1* y promueve su degradación, contribuyendo así a la persistencia del meristema en nódulos maduros (Combiere *et al.*, 2008). Este es un ejemplo interesante de la relevancia de los múltiples niveles de regulación post-transcripcional de la expresión génica durante un proceso de desarrollo, que también integra señales del microsimbionte y del ambiente (ej. la disponibilidad de nitrógeno).

#### **4. La función de miR390 en la formación de raíces laterales y nódulos**

Durante el análisis de los niveles de sRNAs en respuesta a la inoculación fue llamativa la disminución del miR390 a nivel de RNA total. Estudios previos llevados a cabo en *Arabidopsis* mostraron que miR390 se expresa principalmente en los sitios de iniciación de las raíces laterales. Allí, activa la biogénesis de tasiARFs y la inhibición de sus blancos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, promoviendo así el crecimiento de las raíces laterales (Marin *et al.*, 2010). Dicho reporte mostró que miR390 es inducido por el tratamiento con auxinas y es regulado espacialmente por *ARF4*. Los resultados obtenidos en raíces de *M. truncatula* nos llevaron a investigar su posible rol en la



nodulación mediante ensayos de genética reversa. Para ello se realizó una sobreexpresión del precursor de este miRNA. Los ensayos preliminares mostraron que su sobreexpresión alteraba tanto la longitud de las raíces laterales como la formación de nódulos. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de miR390 produciría la acumulación de tasiARFs que modificarían los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* promoviendo así el crecimiento de raíces laterales en *M. truncatula*. De modo similar, las plantas que sobreexpresan el transcripto *TAS3* en *Arabidopsis* mostraron un incremento en la longitud de las raíces laterales. Mientras que las citoquininas inhiben la formación de raíces laterales, posiblemente mediante la inhibición de la acumulación de auxinas en los sitios de iniciación (Plet *et al.*, 2011), la formación de nódulos requiere de la acción de las citoquininas tanto para la iniciación como el mantenimiento de los meristemas (Mathesius 2008). El fenotipo observado sugiere que la sobreexpresión de miR390 podría alterar el desarrollo de nódulos y raíces laterales, probablemente a nivel de su organogénesis. Para evaluar la validez de esta hipótesis es necesaria una caracterización en mayor profundidad del fenotipo. La caracterización del fenotipo se podrá llevar a cabo mediante visualización de los hilos de infección, estructura del nódulo y eficiencia de fijación de nitrógeno. Por otro lado, se podría utilizar también una estrategia de bloqueo de la acción de miR390 mediante la técnica de *mimicry* o STTM (*Short Tandem Target mimic*; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007, Yan *et al.*, 2012). En este método se sobreexpresa una secuencia blanco de miRNA de interés que contiene un cambio de nucleótido en el sitio de corte provocando la captura y el bloqueo de la acción del mismo. En experimentos futuros, sería relevante también evaluar la expresión espacial de los distintos componentes de la vía del miR390 y los tasiARFs durante la formación y crecimiento de las raíces laterales y nódulos, utilizando para ello fusiones transcripcionales de los promotores de interés al gen reportero *GUS*. Los experimentos propuestos son necesarios para validar los datos aquí presentados y caracterizar en profundidad la posible función de miR390 en la simbiosis.

## 5. Extensión de la técnica de TRAP a la leguminosa modelo *M. truncatula*

### 5.1. TRAP a partir de raíz completa y de tipos celulares específicos

Para la optimización de la técnica de TRAP en *M. truncatula* se aplicó la misma estrategia desarrollada previamente en *Arabidopsis*, pero en este caso se utilizó el método de transformación de raíces mediada por *A. rhizogenes* para la expresión de la proteína FLAG-RPL18 bajo el control de promotores constitutivos o específicos de tipos celulares individuales de la raíz. La purificación de polisomas mediante TRAP permitió co-purificar proteínas que forman parte de los complejos ribosomales. La comparación de los perfiles proteicos obtenidos mediante TRAP o la purificación convencional de ribosomas llevó a detectar algunos polipéptidos exclusivamente en los extractos purificados convencionalmente. Estos polipéptidos podrían corresponder a componentes de otros complejos RNPs de alto coeficiente de sedimentación como P *bodies* o gránulos de almacenamiento que co-purifican con los ribosomas durante la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (Halbeisen *et al.*, 2009). Este resultado revela una de las ventajas del uso de TRAP, que consiste en la purificación específica de complejos ribosomales. La purificación por TRAP permitió aislar los rRNAs y mRNAs asociado a los complejos traduccionales. Los rendimientos de RNA obtenidos para raíces 35S:FLAG-RPL18 resultaron de orden similar a los reportados para raíces de plántulas de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009a). El hecho de que un porcentaje de la proteína FLAG-RPL18 se detectó en la fracción no unida a la agarosa anti-FLAG durante TRAP indica que la eficiencia de la purificación puede ser mejorada. Si bien esto sólo se evaluó en las plantas que sobreexpresan FLAG-RPL18, la optimización de la eficiencia de la purificación puede ser un factor relevante cuando esta técnica se aplica a la obtención de poblaciones de RNA asociadas a polisomas de tipos celulares poco abundantes. En *Arabidopsis*, la caracterización a escala genómica de los mRNAs asociados a polisomas mediante el uso de microarreglos de DNA y secuenciación masiva ha permitido explorar los traductomas de órganos completos y de tipos celulares específicos (Mustroph *et al.*, 2009b, Jiao and Meyerowitz 2010). Este nivel de regulación de la expresión génica ha sido poco explorado en plantas leguminosas. El uso de TRAP en *M. truncatula* permitió la evaluación del nivel de regulación traduccional de mRNAs individuales en la simbiosis fijadora de nitrógeno, tanto en la

raíz completa como en los tipos celulares específicos involucrados en este proceso asociativo.

## 5.2. Ventajas del uso de TRAP acoplado a técnicas de secuenciación masiva

La mayoría de los genes involucrados en la vía de señalización de simbiosis fueron identificados por estrategias de genética directa. Sin embargo, aún resta identificar otros miembros de la vía para poder comprender mejor el proceso simbiótico. La redundancia génica es uno de los obstáculos que dificulta el éxito en este objetivo. Por otro lado, las estrategias de genética reversa requieren de criterios para la selección de candidatos. En muchos casos, la selección se realiza en base a datos de transcriptoma obtenidos para los niveles estacionarios de transcripto. Este criterio podría excluir genes que resulten importantes para el desarrollo del nódulo, pero que no cambien significativamente su abundancia en raíces completas (por ejemplo *DMI2*, *NSP1*, *NFP*, *DMI3* y *LYK3*). Algunos de estos genes mostraron ser regulados a diferentes niveles post-transcripcionales que no se ven reflejados a través del análisis del estado estacionario de mRNA. Los resultados obtenidos mediante la técnica de TRAP ponen en evidencia la importancia del nivel traduccional como mecanismo de regulación de la expresión génica. El uso de técnicas como TRAP puede proveer un criterio alternativo para la selección de genes candidatos basado en los niveles de asociación a polisomas. La identificación de nuevos genes regulados a nivel de la traducción requiere de la aplicación de herramientas de análisis a escala global como la secuenciación masiva o la hibridación a microarreglos. En este sentido, cabe mencionar que recientemente hemos conseguido construir bibliotecas para secuenciación masiva mediante la tecnología de Illumina a partir de muestras de RNA total y TRAP de raíces completas inoculadas con *S. meliloti* o con agua como control. Estas bibliotecas fueron validadas y cuantificadas mediante qPCR y se encuentran en etapa de secuenciación. Si bien las muestras obtenidas a partir de tipos celulares específicos resultaron en bajos rendimientos para tipos celulares como córtex y epidermis, existen varias posibilidades para su análisis a escala global. Por un lado se podría incrementar el rendimiento y construir bibliotecas para secuenciación, tal como fueron realizadas por Jiao y Meyerowitz (2010) para caracterizar los diferentes tipos celulares del meristema apical involucrados en la transición de la etapa vegetativa a la reproductiva en *Arabidopsis*. Alternativamente, se

podría realizar una amplificación lineal del RNA como paso previo a la construcción de las bibliotecas para secuenciación masiva. Estudios recientes indican que es posible secuenciar muestras de RNA obtenidas a partir del contenido de una única célula (Hashimshony *et al.*, 2012). Estas técnicas permitirían avanzar en el procesamiento y el análisis de traductomas de tipos celulares poco abundantes.

El uso de la secuenciación masiva presenta algunas ventajas con respecto al uso de microarreglos. Entre ellas se destacan la representación de los transcritos independientemente de su presencia en el microarreglo y la obtención de datos de secuencia. Una de las posibilidades que plantea la secuenciación masiva de muestras de TRAP es el acceso a las poblaciones de mRNAs asociados a polisomas. Estas poblaciones corresponderían a mRNAs que han superado las etapas de control de calidad y se han asociado a polisomas para su traducción. Todo ello permitiría excluir del análisis mRNAs nucleares aberrantes o que no han completado su procesamiento. Estos datos pueden contribuir a la identificación de variantes de *splicing* alternativo estables, mejorando así la anotación de los modelos génicos del genoma de *M. truncatula*.

Otro de los aspectos que permite abordar la obtención de traductomas es la evaluación *in silico* de las características de los mRNAs que presenten regulación a nivel traduccional. En este estudio de baja escala se identificaron secuencias o motivos consenso que están presentes en las regiones no traducidas de algunos de los genes para los que se observaron evidencias de regulación positiva a nivel traduccional en respuesta al rizobio. Estos elementos podrían regular la respuesta traduccional durante la asociación simbiótica. Se plantea realizar una validación estadística de estos elementos mediante el análisis de un mayor número de transcritos. La funcionalidad de los elementos reconocidos podría ser evaluada mediante la generación de construcciones que contengan el ORF del gen *gfp* fusionado transcripcionalmente a los elementos identificados. Este tipo de ensayos permitirá la evaluación de la abundancia de las proteínas y de sus transcritos, y caracterizar como estos niveles se modifican durante la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios.

## 6. Observaciones finales

En este trabajo se utilizó la técnica de TRAP en *M. truncatula*. Este desarrollo provee una herramienta valiosa para analizar la regulación traduccional durante procesos biológicos que involucran la raíz de plantas leguminosas. A diferencia de la planta modelo *Arabidopsis*, *M. truncatula* establece asociaciones simbióticas como la nodulación y la micorrización arbuscular (Parniske 2008). La extensión de esta técnica a *M. truncatula* posibilita el estudio de los mRNAs y sRNAs asociados a complejos traduccionales en este tipo de interacciones. El estudio realizado en esta tesis contribuye a sustentar la importancia de este nivel de regulación en la simbiosis fijadora de nitrógeno. El análisis de un grupo de transcriptos que participan en la vía de señalización de la nodulación permitió obtener evidencias sobre su regulación traduccional en respuesta al rizobio en raíces completas y en tipos celulares específicos como la epidermis, el córtex y el floema. A su vez, los sRNAs seleccionados se encontraron asociados a las muestras TRAP, dando apoyo a la noción de que los sRNAs podrían jugar un rol en la regulación de la traducción. Por otro lado, estos avances pueden extenderse al análisis a gran escala mediante secuenciación masiva, contribuyendo a la identificación de nuevos genes candidatos para su evaluación mediante estrategias de genética reversa. Asimismo, el uso de promotores específicos plantea la posibilidad de extender la comprensión de la regulación post-transcripcional en los tipos celulares donde se desarrolla la simbiosis. Los avances alcanzados ponen en evidencia la relevancia de los niveles de regulación post-transcripcional en los cambios de la expresión génica que ocurren durante el establecimiento de una asociación simbiótica de importancia ecológica y agronómica.

## Materiales y Métodos

### 1. Material biológico

#### 1.1. Material vegetal

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

#### 1.2. Cepas bacterianas

-*Agrobacterium rhizogenes* **ARqua1**. Utilizada para la transformación de raíces de *M. truncatula*. Fue obtenida de la Universidad de Ghent, Bélgica (Quandt 1993).

-*Sinorhizobium meliloti* **1021**. Rizobio utilizado para la inoculación de *M. truncatula*. (Meade 1977).

-*Escherichia coli* **DH5 $\alpha$** . Utilizada para la transformación de vectores plasmídicos y productos de ligaciones.

-*E. coli* **TOP10** (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Utilizada para la transformación de vectores derivados de pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

-*E. coli* **ccdB survival 2 TR1** (Invitrogen). Utilizada para la transformación de vectores plasmídicos compatibles con el sistema de GATEWAY (Invitrogen).

#### 1.3. Vectores de clonado

-**p35S:HF**. Utilizado para la expresión de proteínas conteniendo un epítipo dual HIS-FLAG en su N-terminal (Zanetti *et al.*, 2005). El plásmido posee el gen *Cm<sup>r</sup>* que confiere resistencia a cloramfenicol para su selección en bacterias.

-**p35S:HF-GAT**. Versión derivada del vector p35S:HF compatible con el sistema de GATEWAY (Mustroph *et al.*, 2010).

-**pGAT:HF-L18B**. Vector compatible con el sistema de GATEWAY para el clonado de secuencias promotoras que dirijan la expresión de HIS-FLAG-RPL18B (Mustroph *et al.*, 2009b).

**-pCO2:FLAG-L18B.** Vector derivado de pGAT:HF-L18B que expresa RPL18B de *Arabidopsis* bajo el control del promotor pCO2. Se utilizó para dirigir la expresión de la proteína RPL18 de *M. truncatula* (Heidstra *et al.*, 2004, Mustroph *et al.*, 2009b).

**-pSUC2:FLAG-L18B.** Vector derivado de pGAT:HF-L18B que expresa RPL18B de *Arabidopsis* bajo el control del promotor pSUC2. Se utilizó para dirigir la expresión de la proteína RPL18 de *M. truncatula* (Imlau *et al.*, 1999, Mustroph *et al.*, 2009b).

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

**-pGEM-T-Easy** (Promega, Madison, WI, USA). Vector utilizado para el clonado de productos de amplificación por PCR. El plásmido posee el gen *Amp<sup>r</sup>* que confiere resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

**-pK7WG2D.** Vector compatible con el sistema GATEWAY para la sobreexpresión bajo el promotor CaMV 35S (Karimi *et al.*, 2002). El plásmido posee el gen *Sp<sup>r</sup>* que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias.

#### 1.4. Primers

Los *primers* utilizados en este trabajo se detallan en el Anexo II.

## 2. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico.

### 2.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico

La preparación de DNA plasmídico se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook 2001) a partir de células de *E. coli* transformadas. Las células transformadas con los plásmidos correspondientes se cultivaron en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l) conteniendo el antibiótico adecuado (Tabla 6). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con agitación (150 rpm) hasta saturación. Para cada minipreparación de DNA plasmídico se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 4.000 xg durante 5 minutos y el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de *buffer* P1 (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se adicionaron 200 µl de *buffer* P2 [NaOH 0,2 N, SDS 1 % (p/v)], se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos.

Posteriormente, se adicionaron 150 µl de *buffer* P3 [Acetato de potasio (KAc) 5M pH 4,8] y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos. Luego de centrifugar a 17.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se sometió a una extracción con sílica. Se agregaron 10 µl de suspensión de sílica SiO<sub>2</sub> 1,3 % (p/v) para unir los ácidos nucleicos. A continuación se centrifugó a 10.000 xg durante 10 segundos. El sobrenadante fue descartado, y el sedimento se lavó 3 veces con una solución de lavado [NaCl 50 mM, Tris 10 mM, EDTA 2,5 mM, etanol 50 % (v/v)] mezclando por inversión y centrifugando en cada ocasión. Finalmente el precipitado se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada previamente esterilizada. Se eluyó el DNA desestabilizando la interacción con la suspensión de sílica. Esto se logró manteniendo las muestras a 60 °C durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 17.000 xg por 2 minutos para separar la sílica. Los sobrenadantes conteniendo plásmido se conservaron a -20 °C.

Las preparaciones de DNA plasmídico para enviar a secuenciar, efectuar digestiones plasmídicas y subclonados fueron obtenidas utilizando el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega).

**Tabla 6.** Concentración de antibióticos en medios de cultivo para bacterias

<u>Solución Stock</u>	<u>Cultivos <i>E.coli</i></u>	<u>Cultivos <i>A. rhizogenes</i></u>
Kanamicina 50 mg/ml	Kanamicina 50 µg/ml	Kanamicina 50 µg/ml
Cloranfenicol 50 mg/ml	Cloranfenicol 35 µg/ml	Cloranfenicol 200 µg/ml
Espectinomicina 200 mg/ml	Espectinomicina 50 µg/ml	Espectinomicina 200 µg/ml

## 2.2. Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA plasmídico se realizaron de acuerdo a las condiciones indicadas por los proveedores de cada enzima de restricción en particular. En todos los casos se utilizaron 1 a 5 U de enzima por cada µg de DNA plasmídico a digerir. Las digestiones se llevaron a cabo durante 2-3 horas a 37 °C en un volumen final de 20 µl.

## 2.3. Amplificaciones de fragmentos de DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl. La concentración final de cada *primer* fue de 0,25 µM, de cada desoxiribonucleótido (dNTP) 0,25 mM y de MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM. Se utilizó *buffer* comercial para *Taq* polimerasa



y 0,5 U de enzima (Invitrogen). Como molde se utilizaron células, plásmidos, DNA genómico o cDNA dependiendo del caso. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemania). El ciclado incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de un número de ciclos de desnaturalización, *annealing* y elongación, y una etapa final de elongación. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación exceptuando los casos de amplificación semicuantitativa. Cada ciclo se inició con de 30 segundos a 95 °C. La temperatura de *annealing* se eligió 5 °C por debajo de la temperatura de *melting* de los *primers* utilizados. El ciclo se completó con una incubación a 72 °C durante 1 minuto por cada kpb a amplificar. Finalizados los ciclos, se mantuvo a 72 °C durante 5 minutos para la etapa de elongación final.

Para la amplificación de fragmentos utilizados en subclonados se utilizó la polimerasa *Pfu* (Promega). Esta enzima posee actividad exonucleasa 3' a 5' que permite la corrección de errores en la amplificación (*proofreading*) y carece de actividad transferasa terminal. Se utilizaron las condiciones indicadas por el proveedor de la enzima.

#### **2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Las muestras de DNA plasmídico y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 0,8 % y 1,8 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en *buffer* TBE 0,5X (Tris base 0,045 M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,045 M, EDTA 0.5 mM) y se adicionó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Antes del sembrado se agregó a las muestras 1/6 volúmenes de *buffer* 6X de siembra para DNA [*buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,5 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0]. Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5X a voltaje constante (usando 10 V por cada cm lineal de gel). Para visualizar y registrar las corridas electroforéticas se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y una cámara digital Kodak. Para la captura de imágenes se utilizó el programa Kodak Digital Science v 2.0.3.

## 2.5. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el *kit* comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, Germany) siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 2.6. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA.

Las reacciones de ligación intermolecular de los fragmentos de DNA se realizaron en un volumen final de 20 µl utilizando 1 U de la enzima DNA-ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen) y el *buffer* de reacción suministrado por el proveedor de la enzima. En cada reacción se utilizaron 100 ng de vector y diferentes relaciones molares de inserto:vector que variaron entre 1:1 y 4:1.

## 2.7. Clonado de fragmentos de PCR en *pENTR/D-TOPO*

Este kit permite la incorporación direccional de fragmentos de PCR en un plásmido compatible con el sistema de GATEWAY. Se realizó una amplificación con *primers* para la secuencia de interés que contienen los nucleótidos *CACC* adicionales al extremo 5' del *primer forward*. La reacción con *pENTR/D-TOPO* permite la incorporación del producto de PCR entre las secuencias *attL1* y *attL2* siguiendo el protocolo detallado por el fabricante (Invitrogen). Brevemente, se mezcló 10-50 ng del fragmento amplificado con 0.5 µl del vector *pENTR/D-TOPO* y 0.5 µl de solución salina. Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se plaquearon en medio LB-agar conteniendo kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas.

## 2.8. Recombinación sitio específica mediante el sistema *Gateway* (LR clonasa)

Se realizó una recombinación sitio específica entre el vector *pENTR/D-TOPO* con la construcción adecuada y el vector de destino. El vector de destino contiene las

secuencias *attR1* y *attR2* para permitir la recombinación con las secuencias *attL1* y *attL2* del *pENTR/D-TOPO*. Se mezcló 1  $\mu$ l vector *pENTR/D-TOPO* (100 ng/ $\mu$ l) conteniendo el fragmento de interés con 1  $\mu$ l del vector de destino (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l la enzima LR clonasa y 2  $\mu$ l de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) siguiendo los pasos indicados en el manual (Invitrogen). Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche (condición recomendada cuando el tamaño de los plásmidos de destino es mayor a 10 kpb). Luego de este paso se adicionó 1  $\mu$ l de proteinasa K para inactivar la enzima y se incubó 10 minutos a 37 °C. Con la mezcla de reacción obtenida se transformaron células de *E. coli* DH5 competentes. Posteriormente, las transformantes se seleccionaron en medio LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en el vector de destino (Tabla 6).

### **2.9. Preparación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ competentes**

Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se cultivaron en medio LB durante una noche a 37 °C con agitación (150 rpm). Se utilizaron 500  $\mu$ l del cultivo saturado para inocular 50 ml de LB, incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,5. Se centrifugó 2 minutos a 2.600 xg y luego se resuspendió en 12,5 ml de la solución de transformación 1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Se repitió la centrifugación, resuspendiendo luego en 12,5 ml de solución de transformación 2 (MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 6,5). Luego de 15 minutos de incubación en hielo, se centrifugó nuevamente, resuspendiendo en 2,5 ml de solución de transformación 2. Alícuotas de 150  $\mu$ l se fraccionaron en tubos eppendorf y se conservaron a - 80 °C hasta su utilización.

### **2.10. Transformación de células DH5 $\alpha$ competentes**

Una suspensión de las células competentes (150  $\mu$ l) se mezcló con 2  $\mu$ l de plásmido (50 ng/ $\mu$ l) y se incubó en hielo por 30 minutos. Se realizó luego un tratamiento térmico (*heat shock*) incubando la muestra a 42 °C durante 45 segundos, y se enfrió en hielo por 2 minutos. Seguidamente se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) durante una hora. La mezcla de la

transformación se plaqueó en medio LB-agar con el antibiótico adecuado (ver Tabla 6) y las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas.

### **3. Construcción de plásmidos**

#### **3.1 Construcción de plásmidos para expresar RPL18 de *M. truncatula* bajo el control de distintas secuencias promotoras**

##### **3.1.1. Obtención de p35S:FLAG-RPL18 mediante el clonado de RPL18 en el vector p35S:HF**

Se diseñaron *primers* para amplificar el marco abierto de lectura (ORF) de *RPL18* a partir de la secuencia disponible en el genoma de *M. truncatula* (gen Medtr1g083460). El *primer* 5` **MtRPL18 BamHI Fwd** contiene el sitio de restricción de *Bam*HI y el *primer* 3` **MtRPL18 XbaI Rev** lleva el sitio *Xba*I para su posterior clonado en el vector p35S:HF (Anexo II). Se realizó una amplificación por PCR sobre cDNA de tejido de raíz de *M. truncatula* Jemalong A17 (sintetizado tal como se detalla en la sección 8.2.). El fragmento de DNA obtenido se purificó, se digirió con las enzimas de restricción correspondientes y se ligó en el vector p35S:HF previamente digerido, separado en gel de agarosa y purificado. Los productos de la ligación se utilizaron en la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente, se aislaron los plásmidos recombinantes. La fusión en fase del ORF de *RPL18* al epítipo HF se confirmó por secuenciación del DNA con los *primers* **CaMV 35S Fwd** y **3`OCS Rev** (Anexo II). La construcción obtenida se denominó p35S:FLAG-RPL18 y la región secuenciada se presenta en el Anexo I.

##### **3.1.2. Obtención de pCO2:FLAG-RPL18 y pSUC2:FLAG-RPL18**

En nuestro laboratorio se disponía de los plásmidos pCO2:FLAG-L18B y pSUC2:FLAG-L18B que expresan la proteína RPL18B de *Arabidopsis* (Mustroph *et al.*, 2009b). Se reemplazó el ORF de *Arabidopsis* por el correspondiente a *M. truncatula*. Para ello se utilizó el plásmido obtenido previamente p35S:FLAG-RPL18. Se realizó una digestión de cada DNA plasmídico con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I. Los fragmentos de DNA obtenidos se separaron en geles de agarosa 0,8 %

(p/v). Para p35S:FLAG-RPL18 se purificó el fragmento correspondiente al ORF de RPL18, mientras que para pCO2:FLAG-L18B y pSUC2:FLAG-L18B se purificaron los fragmentos correspondientes a cada plásmido lineal luego de que se haya liberado por la digestión el ORF de la *RPL18B* de *Arabidopsis*. Se realizaron ligaciones de los productos purificados con el ORF de *RPL18* de *M. truncatula*. Los productos de la ligación se utilizaron en la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente, se aislaron los plásmidos recombinantes, los cuales fueron secuenciados a partir de la región 3' del gen *ocs* (*primer 3' OCS Rev*) y desde la región del plásmido previa a los promotores para confirmar la presencia del promotor correcto (*primer SEQpGAT*). Las secuencias obtenidas se presentan en el Anexo I. Las construcciones obtenidas se denominaron pCO2:FLAG-RPL18 y pSUC2:FLAG-RPL18 respectivamente.

### **3.1.3. Obtención de pEXP7:FLAG-RPL18**

La construcción pEXP7:FLAG-RPL18 se obtuvo por reemplazo del promotor CaMV 35S por el promotor del gen *EXP7* de *M. truncatula*. Se diseñaron los *primers MtEXP7 EcoRI 342 Fwd* y *MtEXP7 SacI 18 Rev* según las secuencias descritas por (Kim *et al.*, 2006) a las que se le adicionaron sitios de restricción *EcoRI* y *SacI* para realizar el reemplazo sobre p35S:FLAG-RPL18. Se realizó una amplificación por PCR a partir de DNA genómico de *M. truncatula* Jemalong A17 (extraído tal como se detalla en la sección 7.1.). El fragmento de DNA obtenido se purificó y se digirió con las enzimas de restricción correspondientes. A su vez, el vector p35S:FLAG-RPL18 se digirió con las enzimas *EcoRI* y *SacI* y se separó en gel de agarosa 0,8 %. Se purificó el producto correspondiente al plásmido descartando el fragmento correspondiente al promotor CaMV 35S. Se realizó una ligación con los fragmentos purificados. Los productos de la ligación se utilizaron en la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente, se aislaron los plásmidos recombinantes, los cuales fueron secuenciados a partir de la región 3' del gen *ocs* (*primer 3' OCS Rev*) y desde la región del plásmido previa a los promotores para confirmar la presencia del promotor correcto (*primer SEQpGAT*). La secuencia obtenida se presenta en el Anexo I. La construcción obtenida se denominó pEXP7:FLAG-RPL18.

### 3.2. Construcciones para evaluar la actividad de los promotores pEXP7, pCO2 y pSUC2 en raíces de *M. truncatula*

Para evaluar la expresión espacial de RPL18 bajo los promotores pCO2 y pSUC2 y su localización subcelular se utilizaron las construcciones pCO2:FLAG-GFP-RPL18 y pSUC2:FLAG-GFP-RPL18 descritas por (Mustroph *et al.*, 2009b). Estas construcciones dirigen la expresión de GFP fusionada a la proteína RPL18B de *Arabidopsis*. Para evaluar la expresión espacial del promotor pEXP7 se realizó la incorporación de GFP en el plásmido pEXP7:FLAG-RPL18. Se digirió el plásmido pSUC2:FLAG-GFP-RPL18 con *Bam*HI para liberar la secuencia que codifica GFP. Se purificó el fragmento tamaño esperado y se ligó al vector pEXP7:FLAG-RPL18 previamente linealizado con *Bam*HI. Los productos de la ligación se utilizaron en la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente, se aislaron los plásmidos recombinantes. Los plásmidos fueron secuenciados a partir del marco abierto de lectura de RPL18 (**MtRPL18 Rev seq**). La secuencia se presenta en el Anexo I.

### 3.3. Construcción para sobreexpresar miR390

Esta construcción fue diseñada y generada por la Dra. Pilar Bustos del laboratorio del Dr. Martín Crespi en el *Institut des Sciences du Vegetal* CNRS, Gif Sur Yvette, Francia y gentilmente cedida a nuestro laboratorio. Se realizó una amplificación por PCR del pre-miR390b a partir de DNA genómico de *M. truncatula* Jemalong A17. Se utilizaron los *primers* **pre-miR390b Fwd** y **pre-miR390b Rev**. Este fragmento fue purificado y clonado en el vector *pENTR/D-TOPO*. Posteriormente se realizó una recombinación sitio específica entre *pENTR/D-TOPO* y pK7WG2D, utilizando la LR clonasa (Invitrogen). Los productos de la recombinación se utilizaron en la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Posteriormente, se aislaron los plásmidos recombinantes. La construcción fue confirmada por secuenciación.

#### 4. Generación de plantas compuestas de *M. truncatula*

##### 4.1 Preparación de células de *A. rhizogenes* ARqua1 electrocompetentes

Las células de *A. rhizogenes* ARqua1 se cultivaron en medio LB durante una noche a 30 °C con agitación (150 rpm). Este cultivo saturado se utilizó para inocular 50 ml de LB, incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,6. El cultivo bacteriano se enfrió en hielo durante 15-30 minutos y se centrifugó a 6.000 xg durante 10 minutos. Una vez removido el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 ml de glicerol 10 % (v/v). Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, descartando luego el sobrenadante y resuspendiendo en 25 ml de glicerol 10 % (v/v). El mismo procedimiento se repitió reduciendo el volumen de solución de glicerol a 4 ml, llegando luego a la solución final en la que se resuspendió el producto de la centrifugación en 500  $\mu$ l de glicerol 10 % (v/v). Finalmente se fraccionó en alícuotas de a 40  $\mu$ l, se colocaron los tubos rápidamente en  $N_2$  líquido y se almacenaron a -80 °C.

##### 4.2. Transformación de células de *A. rhizogenes* ARqua1 mediante electroporación

Se utilizaron cubetas de electroporación de un espesor de 2 mm mantenidas a -20 °C. Cien ng de plásmido se mezclaron con 40  $\mu$ l de células electrocompetentes, mantenidas en hielo. Luego, la mezcla se transfirió a la cubeta y se produjo un pulso de 1,8 kV/200 /25 $\mu$ F con un electroporador *Gene Pulser* (BioRad, Hércules, CA, USA). Inmediatamente se agregó 1 ml de LB. La mezcla se transfirió a un tubo de cultivo estéril de 15 ml y se incubó con agitación a 28 °C por una hora. La células se plaquearon en medio LB-agar con el antibiótico adecuado (Tabla 6) y se incubaron a 28 °C durante 2-3 días.

##### 4.3. Esterilización y germinación de semillas de *M. truncatula*

Las semillas de *M. truncatula* se escarificaron químicamente mediante inmersión en  $H_2SO_4$  anhidro 98 % (v/v) y agitación hasta la aparición de pequeños puntos negros en las semillas (alrededor de 5 por semilla). Una vez generados, se

removió cuidadosamente todo el  $H_2SO_4$  y se realizaron tres lavados con agua destilada fría. Posteriormente se realizó la esterilización de las semillas por incubación durante 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio 12 g/l. Se realizaron seis lavados con agua destilada estéril dentro del flujo laminar. Utilizando pinzas estériles se transfirieron hasta 50 semillas por cada placa de petri conteniendo  $H_2O$ -agar 8 % (p/v). Las placas se colocaron invertidas a 4 °C en oscuridad durante al menos dos días para sincronizar la germinación y obtener radículas rectas. Al cabo de dicho tiempo, las semillas se transfirieron a 20 °C y se incubaron por aproximadamente 30 horas. A este tiempo las radículas presentaron la longitud adecuada (aproximadamente 10 mm) para realizar la transformación con *A. rhizogenes*.

#### **4.4. Transformación de raíces de *M. truncatula* utilizando *A. rhizogenes***

##### **ARqua1**

La transformación de raíces se realizó como fue descrito en (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Brevemente, dos días antes de la transformación se cultivaron las bacterias ARqua1 transformadas con la construcción de interés. Se utilizó una placa de LB-agar, conteniendo los antibióticos correspondientes, por cada 50 semillas a transformar. El día previo a la transformación se colocaron las semillas previamente esterilizadas a 20 °C para permitir la germinación coordinada. Luego de aproximadamente 30 horas se realizó la transformación en condiciones de esterilidad. Las plántulas se colocaron en una placa de petri conteniendo agua destilada estéril para evitar la deshidratación de las radículas. Cada radícula fue cortada unos 2-3 mm por encima de la punta de la raíz. La superficie seccionada se cubrió con el cultivo de *A. rhizogenes*. Posteriormente las plántulas se colocaron en una placa de petri conteniendo medio Fahraeus-agar [(Fahraeus 1957)  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,114 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,12 g/l, Citrato férrico 0,005 g/l,  $KH_2PO_4$  0,1 g/l,  $Na_2HPO_4$  0,15 g/l, KCl 3,73 mg/l,  $H_3BO_3$  1,55 mg/l,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,85 mg/l,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,13 mg/l,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,018 mg/l]] suplementado con  $KNO_3$  8mM y conteniendo kanamicina 25 mg/l. Se colocaron cinco plántulas por placa de petri evitando que la parte aérea tome contacto con el medio. Las placas se sellaron con *parafilm* y se realizaron cortes para permitir el intercambio gaseoso. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-350HT a 20 °C, 50 % humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas durante 7 días. Estas condiciones de temperatura y humedad mejoran la eficiencia de transformación. Al comenzar la segunda semana



comenzaron a formarse las primeras raíces y se modificó la temperatura a 25 ° C, que es la temperatura óptima de crecimiento para *M. truncatula*. Al comienzo de la tercer semana las plántulas que desarrollaron raíces fueron transferidas a placas de petri cuadradas de 12 cm de lado conteniendo medio Fahraeus sin antibiótico para favorecer el desarrollo de la raíz transgénica. Luego de 5 días en este medio las plántulas pueden ser inoculadas o transferidas a otros medios para ensayos de nodulación.

## **5. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas**

### **5.1. Inoculación de las raíces de *M. truncatula* con *S. meliloti***

Semillas de *M. truncatula* Jemalong A17 se esterilizaron y germinaron como se detalló en la sección 4.3. Seguidamente se transfirieron a cajas de petri cuadradas de 12 cm conteniendo medio Fahraeus-Agar sin fuente de nitrógeno cubierto con papel estéril. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-350HT a 20 °C, 50 % humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas. Luego de 7 días se realizó la inoculación con *S. meliloti* 1021. Los rizobios se crecieron en medio TY suplementado con estreptomicina 400 µg/ml a 28 °C y 200 rpm de agitación. El día de la inoculación se largó un cultivo fresco que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,8. Posteriormente se realizó una dilución 1:1.000 del cultivo de rizobio en agua destilada estéril. Cada placa se inoculó con 10 ml de esa dilución y se colocó en posición horizontal por una hora. El exceso de solución se retiró y se regresaron las cajas a la cámara. Las plantas no inoculadas fueron incubadas con 10 ml de agua destilada estéril como tratamiento control. A diferentes tiempos luego de la inoculación se colectó tejido de raíz en ambas condiciones.

Las plantas compuestas de dos semanas fueron transferidas a cajas de petri cuadradas de 12 cm conteniendo medio Fahraeus-Agar sin fuente de nitrógeno cubierto con papel estéril. Las placas se incubaron en las mismas condiciones que las plantas no transformadas. Luego de cinco días se realizó la inoculación con *S. meliloti* 1021 tal como se describió en el párrafo anterior. Las plantas se utilizaron tanto para la colección de tejido de raíz a distintos tiempos luego de la inoculación como para la evaluación del fenotipo de las plantas compuestas. El tejido colectado se pulverizó con mortero utilizando nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

## 5.2. Ensayos de nodulación en perlita/arena

La eficiencia de nodulación de las plantas compuestas se evaluó mediante ensayos de nodulación en macetas. Las plantas compuestas desarrolladas a las 3 semanas luego de la transformación se transfirieron a macetas individuales de 150 ml conteniendo perlita:arena (3:1) y se regaron con medio Fahraeus sin fuente de nitrógeno. Las macetas se colocaron en recipientes plásticos y se cubrieron con film adherente para evitar la deshidratación provocada por el cambio en las condiciones de humedad en el pasaje de caja a maceta. Luego de 2 días se realizaron pequeños agujeros a la cobertura para disminuir gradualmente la humedad dentro del recipiente. Pasados 5 días se realizó la inoculación con *S. meliloti* 1021. El rizobio se cultivó de la misma manera que lo indicado en la sección anterior. Se realizó una dilución de rizobios en el medio Fahraeus hasta una  $DO_{600}$  de 0,01. Se inoculó con 60 ml de esta solución por cada maceta. Las plantas se colocaron en la cámara con las mismas condiciones. Luego de 15 días se removió la mezcla de perlita:arena y se cuantificaron los nódulos formados por raíz.

## 5.3. Evaluación fenotípica de plantas compuestas

Las plantas compuestas de 2 semanas fueron transplantadas a cajas de petri cuadradas conteniendo medio agar-Fahraeus suplementado con  $KNO_3$  sin kanamicina. Luego de una semana en estas condiciones se evaluó el número de hojas de cada plántula. Se determinó la longitud de la parte aérea. La longitud de las raíces y de las raíces laterales se determinó para cada plántula luego de retirarla de la caja.

## 6. Técnicas para la obtención de polisomas

### 6.1. Purificación de polisomas mediante TRAP a partir de raíces de *M. truncatula*

Este procedimiento requiere el uso raíces transgénicas. El tejido de raíces que expresan la proteína de fusión FLAG-RPL18 se colectó en nitrógeno líquido y pulverizó utilizando morteros hasta obtener un polvo muy fino. Se preparó el *buffer* de extracción de polisomas (PEB) a partir de soluciones stock preparadas previamente (Tabla 7).

Alrededor de 5 ml de tejido se colocaron en 10 ml PEB (Tabla7) y se dejaron descongelar en hielo. Se utilizaron homogenizadores de vidrio previamente esterilizados. El homogenato obtenido se mantuvo por 10 minutos en hielo y se realizó una primera centrifugación a 16.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando *Miracloth* (Calbiochem, La Jolla, CA) y se transfirió a un nuevo tubo. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones para evitar la presencia de restos celulares en los sobrenadantes de las muestras. Esta muestra se denominó S-16 por sobrenadante de la centrifugación a 16.000 xg. Luego de este paso se reservó una alícuota del S-16 para realizar la extracción de RNA o electroforesis de proteínas totales de raíz. El S-16 se conservó en hielo mientras se preparó la resina de anticuerpo  $\alpha$ -FLAG M2 conjugado a agarosa (No. de catálogo F2426, Sigma, St Louis, MI, USA). Doscientos  $\mu$ l de resina se lavaron con 1,5 ml de WBB (*buffer* de lavado de la resina, ver Tabla 7) y se centrifugaron a 8.200 xg durante 30 segundos a 4 °C. Luego de repetir el lavado se realizó la incubación del S-16 con la resina  $\alpha$ -FLAG M2 conjugado a agarosa. Cada muestra se agitó suavemente durante 2 horas en hielo. Posteriormente se centrifugó a 8.200 xg durante 2 minutos a 4 °C para obtener la resina  $\alpha$ -FLAG M2. Se conservó una fracción del sobrenadante, el material no unido (UB), para su análisis en los casos que se requería. Se realizaron cuatro lavados con 6 ml de WB (*wash buffer*, ver Tabla 7) agitando durante 5 minutos en hielo. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y se colocaron 300  $\mu$ l de *buffer* de elución, que consiste en WB conteniendo péptido 3X FLAG (No. de catálogo F4799, Sigma) en una concentración final de 200 ng/ $\mu$ l. Durante 30 minutos se agitó suavemente en hielo. Luego de una centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente se tomó el sobrenadante que contiene el eluido de la purificación por afinidad denominada como muestra TRAP. Esta muestra fue utilizada para la extracción de RNA o la electroforesis de proteínas.

Tabla 7. Soluciones para TRAP

<u>Solución Stock</u>	<u>PEB</u>	<u>WB</u>	<u>WBB</u>
Tris-HCl 2 M pH 9,0 <sup>a</sup>	Tris-HCl 200 mM pH 9,0	Tris-HCl 200 mM pH 9,0	Tris-HCl 200 mM pH 9,0
KCl 2 M <sup>a</sup>	KCl 200 mM	KCl 200 mM	KCl 200 mM
EGTA 0,5 M pH 8,0 <sup>a</sup>	EGTA 25 mM pH 8,0	EGTA 25 mM pH 8,0	EGTA 25 mM pH 8,0
MgCl <sub>2</sub> 1 M <sup>a</sup>	MgCl <sub>2</sub> 35 mM	MgCl <sub>2</sub> 35 mM	MgCl <sub>2</sub> 35 mM
Detergent mix 20 % <sup>ab</sup>	Detergent mix 1 %	-	-
PTE 10 %	PTE 1 %	-	-
DTT 500 mM	DTT 1 mM	DTT 1 mM	-
PMSF 100 mM <sup>c</sup>	PMSF 1 mM	PMSF 1 mM	-
Cicloheximida 50 mg/ml <sup>d</sup>	Cicloheximida 50 µg/ml	Cicloheximida 50 µg/ml	-
Cloranfenicol 50 mg/ml <sup>d</sup>	Cloranfenicol 50 µg/ml	Cloranfenicol 50 µg/ml	-

<sup>a</sup> Soluciones autoclavadas.

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

<sup>c</sup> Solución preparada en isopropanol.

<sup>d</sup> Solución preparada en etanol.

## 6.2. Purificación de polisomas mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa

Este procedimiento se puede utilizar tanto con raíces transgénicas como en las no transformadas. El tejido se procesó hasta obtener el sobrenadante S-16 de la misma manera que para la técnica de TRAP y se conservó en hielo hasta su uso. Se preparó un colchón de sacarosa 1.7 M según se indica en la Tabla 8. Se colocaron ocho ml de esta solución en un tubo de policarbonato para el rotor de ultracentrífuga 70Ti (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). El S-16 se cargó sobre el colchón de sacarosa suavemente para evitar que se mezclen ambas fases y se ultracentrifugó a 170.000 xg durante 3 horas a 4 °C. Luego de la centrifugación se colectó el sobrenadante (S-170) y se conservó una alícuota del mismo para su posterior análisis. El resto del S-170 se descartó al igual que el colchón de sacarosa cuidando de no perturbar el precipitado de ribosomas (P-170). Luego, el precipitado se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y se procedió a la resuspensión del precipitado utilizando el *buffer* de resuspensión indicado en la Tabla 8. Tras pipetear suavemente la solución por encima del precipitado, se dejó en hielo durante 30 minutos para mejorar la resuspensión. La muestra resuspendida se transfirió a un nuevo tubo. P-170 se utilizó posteriormente para la electroforesis de proteínas o el fraccionamiento de polisomas en gradientes de densidad de sacarosa.

**Tabla 8. Soluciones para la obtención de polisomas mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa.**

<u>Solución Stock</u>	<u>Colchón de sacarosa</u>	<u>Buffer de resuspensión</u>
Tris-HCl 2 M pH 9,0	Tris-HCl 400 mM pH 9,0	Tris-HCl 200 mM pH 9,0
KCl 2 M	KCl 200 mM	KCl 200 mM
EGTA 0,5 M pH 8,0	EGTA 50 mM pH 8,0	EGTA 25 mM pH 8,0
MgCl <sub>2</sub> 1 M	MgCl <sub>2</sub> 35 mM	MgCl <sub>2</sub> 35 mM
Sacarosa	Sacarosa 1,75 M	-
DTT 500 mM	DTT 5 mM	DTT 5 mM
PMSF 100mM	-	PMSF 1 mM
Cicloheximida 50 mg/ml	Cicloheximida 50 µg/ml	Cicloheximida 50 µg/ml
Cloranfenicol 50 mg/ml	Cloranfenicol 50 µg/ml	Cloranfenicol 50 µg/ml

Los ribosomas obtenidos se separaron en gradiente de densidad de sacarosa 20-60 % (p/v). La preparación de gradientes se realizó manualmente a partir de soluciones stock (Tabla 9). Cada gradiente se preparó en tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter Inc. 326819) para el rotor SW55.1 de 5 ml. Se colocaron 0,75 ml de la primera solución (Tabla 9) que contiene sacarosa 60 % (p/v) al fondo del tubo y se congeló en freezer de -80 °C por una hora. Se repitió el procedimiento cargando 1,5 ml de las soluciones de sacarosa de 45 % (p/v) y 30 % (p/v) y 0,75 ml de la solución 20 % (p/v). Los gradientes se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El día de la preparación se descongelaron a 37 °C durante una hora y posteriormente se enfriaron en hielo por una hora. Seguidamente se cargaron 1000 unidades de Absorbancia a 260 nm de P-170 y se realizó una ultracentrifugación a 237.000 xg durante una hora y media a 4 °C. Finalizado el procedimiento se utilizó un fraccionador de gradientes 185 acoplado a un lector de absorbancia UA5 (ISCO, Lincoln, NE, USA). Como primer paso se cargó un gradiente preparado y tratado de igual manera, sembrado con *buffer* de resuspensión sin muestra como blanco y se registraron las absorbancias a 254 nm. Posteriormente se analizó cada una de las muestras. Luego de pasar por el detector las muestras se colectaron en fracciones de 400 µl y se colocaron en hielo para evitar la degradación del RNA. Los datos colectados se analizaron para sustraer la absorbancia del blanco, calcular el área de cada región y la proporción de monosomas y polisomas tal como se describe en (Kawaguchi *et al.*, 2003). Para las extracciones de RNA, se agregaron 2 volúmenes de cloruro de guanidinio 8 M y 3 volúmenes de etanol 99 % (v/v). Las muestras se dejaron precipitar durante toda la noche a -20 °C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 16.000 xg durante 45 minutos a 4 °C. A partir de este precipitado se realizó una extracción con Trizol (Invitrogen) como se detalla en la sección 7.2.2.

Para las extracciones de proteínas, a cada fracción del gradiente se le adicionaron 2 volúmenes de etanol 99 % (v/v) y la mezcla se dejó precipitar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó una centrifugación a 16.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Los precipitados se lavaron con etanol 70 % (v/v) y se resuspendieron en *buffer* de siembra para SDS-PAGE 2X [Tris-HCl 20mM pH 7,0, EDTA 4 mM, SDS 4 % (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 1 % (v/v), glicerol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 1 mg/ml].

**Tabla 9. Soluciones para la preparación de gradientes de densidad de sacarosa.**

Sacarosa 68.5 % (p/v) (ml) <sup>a</sup>	Solución de Sales 10 X (ml) <sup>b</sup>	Agua bidestilada estéril (ml)	Cicloheximida 50 mg/ml (ul)	Cloranfenicol 50 mg/ml (ul)	Volumen en el gradiente (ml)	Sacarosa final % (p/v)
44	5	0,99	5	5	0,75	60
66	10	23,98	10	10	1,5	45
44	10	45,98	10	10	1,5	30
14,5	5	30,49	5	5	0,75	20

<sup>a</sup> Solución autoclavada por 15 minutos.

<sup>b</sup> Solución de Tris-HCl 0,4 M pH 8,4, KCl 0,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M autoclavada por 15 minutos.

## 7. Métodos para la extracción, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos

### 7.1. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo a partir de hojas de *M. truncatula* Jemalong A17 siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta *et al.*, (1983). El tejido se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero. El polvo se transfirió a un tubo y se añadieron 15 ml de *buffer* de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,05 M pH 8,0; NaCl 0,5 M; 2- $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 M). Se agregó 1 ml de SDS 20 % (p/v), la mezcla se agitó en vórtex y se incubó 10 min a 65 °C. Luego, se adicionaron 5 ml de acetato de potasio 5 M y se mezclaron por inversión. La muestra se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una malla de nylon de 20  $\mu$ m y se añadieron 10 ml de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó 30 minutos a -20 °C. La muestra se centrifugó a 17.000 xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 1,4 ml de *buffer* TE, pH 7,4 manteniendo toda la noche a 4 °C. La muestra se transfirió a tubos nuevos. Con el objeto de precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 75  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se mezclaron por inversión y se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol. La muestra se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó a 17.000

xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 200 µl de *buffer* TE, pH 7,4 y se mantuvo toda la noche a 4 °C. Para eliminar el RNA presente en la muestra se digirió con 10 µg/ml de RNAsa libre de DNAsa (Promega) durante 30 minutos a 37 °C. Se agregó acetato de amonio a una concentración final 2 M pH 7,5 y se realizó una extracción con 0,5 volúmenes de fenol y 0,5 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se agitó 2 minutos y se centrifugó en una microcentrífuga a 17.000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, se recuperó la fase acuosa y el DNA genómico se precipitó adicionando acetato de sodio a una concentración final 0,2 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 96 % (v/v) a -20 °C. La muestra se colocó 10 minutos en hielo y se centrifugó a 17.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 % (v/v), a 4 °C. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de *buffer* TE incubando toda la noche a 4 °C. El DNA genómico obtenido se almacenó a 4 °C.

## **7.2. Extracciones de RNA**

### **7.2.1 Extracciones de RNA a partir de tejido de raíz**

Para la extracción de RNA se colectaron las raíces y se pulverizaron con mortero utilizando N<sub>2</sub> líquido. El tejido obtenido se almacenó en *freezer* a -80 °C hasta su utilización. El RNA se extrajo siguiendo el protocolo provisto con el kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel). La elución se realizó con 50 µl de agua estéril y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La concentración de la muestras se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) medida en un espectofotómetro nanodrop ND 2000 (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) y se estimó su pureza a través de la relación  $A_{260}/A_{280}$ . La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis no desnaturante en geles de agarosa 1.2 % (p/v), visualizándose las bandas correspondientes al rRNA.

### **7.2.2 Extracciones de RNA a partir de muestras de TRAP**

Las fracciones de S-16 y TRAP fueron utilizadas para la extracción de RNA. Para ambas muestras se realizó una extracción con Trizol (Invitrogen) siguiendo las condiciones detalladas por el proveedor. En forma resumida, a cada muestra se agregaron 800 µl de reactivo Trizol y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se realizó una extracción con 200 µl de cloroformo. Se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Se repitió la extracción con cloroformo conservando la fase acuosa. El RNA se precipitó adicionando 500 µl de isopropanol e incubando toda la noche -20 °C. En este paso, para ayudar a la precipitación de las muestras TRAP se agregó 1 µl de glucógeno 20 µg/µl (Invitrogen, N° de catálogo 10814-010). Las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 45 minutos a 4 °C. Los precipitados de RNA fueron lavados con etanol 70 % (v/v). Finalmente, el RNA se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril y se calentó a 65 °C durante 5 minutos para favorecer la resuspensión del precipitado. Se evaluaron la concentración y la integridad igual que para las muestras de RNA total de raíz (sección 7.2.1.). El RNA se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### **7.2.3 Extracciones de RNA a partir de muestras de polisomas obtenidas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa**

Se realizaron extracciones de RNA utilizando el método de Trizol. Las fracciones precipitadas fueron resuspendidas en 800 µl de reactivo de Trizol. Se tomaron por separado las fracciones correspondientes a monosomas y de polisomas. Para ambas muestras se realizaron extracciones de RNA siguiendo los pasos detallados en la sección 7.2.2. El RNA se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril y se calentó a 65 °C durante 5 minutos para favorecer la resuspensión del precipitado. El RNA se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La concentración y la integridad del RNA se evaluaron igual que para las muestras de RNA total de raíz (7.2.1).



## 8. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcriptos

### 8.1. Digestión de DNA genómico en muestras de RNA

Se realizó la digestión de DNA genómico para las muestras de RNA total extraído a partir de tejido de raíz. Este tratamiento fue aplicado también a las muestras de S-16 provenientes de la técnica de TRAP. En cada caso, se digirió 1 µg de RNA con 1 U de la enzima RQ1 DNasa libre de RNasa (Promega) utilizando el *buffer* suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 µl. Luego de incubar durante una hora a 37 °C se agregó 1 µl de la solución *Stop* (EGTA 10 mM, Promega). Se incubó durante 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

### 8.2. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó con partiendo de 200 ng-1 µg de RNA (según disponibilidad). La primera etapa consistió en el agregado de 0,5 µg de oligodT<sub>15</sub>. Luego, se incubó durante 5 minutos a 70 °C para desnaturalizar el RNA y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente se agregó una mezcla conteniendo 200 U de la enzima transcriptasa reversa (MMLV RT, Promega), dNTPs a una concentración final de 0,5 mM cada uno y *buffer* 1X (Promega), llevando a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Luego se incubó durante una hora a 42 °C y finalmente 15 minutos a 65 °C para inactivar la enzima. El producto de la reacción se conservó a -20 °C hasta su uso.

### 8.3 Ensayos de qPCR

Cinco µl de una dilución 1/10 de la síntesis de la primera hebra de cDNA fueron utilizados como molde en una reacción de PCR cuantitativa. Se utilizó una concentración de 0,5 µM de cada *primer* en un volumen final de 20 µl. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *iQ SYBR Green Supermix* de BioRad. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real *CFX96 Real-Time System* (BioRad) con una primera etapa a 95 ° durante 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 23 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 20 segundos a 72 °C. La amplificación de un único producto fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) teñido

con bromuro de etidio. También se realizaron curvas de *melting* para cada producto de reacción al finalizar la corrida.

#### **8.4. Análisis y normalización de los datos de qPCR**

Los datos del ciclo de detección umbral (Ct) fueron obtenidos como mínimo para dos réplicas técnicas para cada cuantificación. Se realizó una curva de calibración para los transcriptos utilizando diluciones seriadas del cDNA sintetizado. Se analizó la validez de los transcriptos de referencia *ACTINA11* y de *HISTONA3L* mediante GNORM (Vandesompele *et al.*, 2002, Ariel *et al.*, 2010). Estos transcriptos se utilizaron para la normalización de los datos según se describió previamente (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad v 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

### **9. Métodos para la cuantificación de los niveles de sRNAs**

#### **9.1. Síntesis de cDNA utilizando el sistema miScript**

Para la cuantificación de sRNAs se realizó la poliadenilación y síntesis de cDNA utilizando el *miScript Reverse Transcription Kit* provisto por la compañía QIAGEN (Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones provistas con el mismo. Cada reacción contuvo 200 ng de RNA extraído con Trizol, *buffer miScript* y la mezcla de transcripción reversa *miScript*. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 60 minutos y luego las enzimas se inactivaron incubando a 95 °C por 5 minutos. El producto de la reacción se conservó a -20 °C hasta su uso.

#### **9.2. Ensayos de qPCR para sRNAs**

Se utilizó el protocolo de detección de sRNA *miScript SYBR Green PCR Kit* provisto por QIAGEN. Se utilizó la *Quantitect SYBR Green PCR Master Mix 2X*, el *miScript Universal Primer 10X*, y el *primer* correspondiente al sRNA de interés (Anexo II). Se utilizó como molde cDNA sintetizado por el kit *miScript*. Cada reacción contuvo el equivalente a 1-3 ng de RNA utilizados para la transcripción reversa. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad) con

una primera etapa a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 30 segundos a la temperatura de *annealing* elegida en base a la temperatura de *melting* del *primer* de cada sRNA (Anexo II). La amplificación de un único producto fue verificada mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v). También se realizaron curvas de *melting* para cada producto de reacción luego de finalizar la corrida. La normalización de los datos fue realizada mediante la cuantificación de *ACTINA11* y de *HISTONA3L* según se describió previamente. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad v 4.0.

### **9.3. Clonado y secuenciación de los productos de qPCR**

Los sRNAs amplificados fueron separados por una electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v). Las bandas fueron escindidas del gel y purificadas. Los fragmentos se ligaron al vector *pGEM-T-Easy* (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. El producto de la ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5 competentes. Los plásmidos fueron purificados y secuenciados con el *primer M13\_Fwd* para verificar la identidad de los sRNAs amplificados.

## **10. Métodos utilizados para el análisis de proteínas**

### **10.1. Preparación de muestras de proteínas**

Las proteínas totales de raíz fueron extraídas a partir de tejido pulverizado en nitrógeno líquido. Se utilizaron 100 µl de tejido extraídos con 100 µl de *buffer* de carga SDS 2X [Tris-HCl 10mM pH 7,0, EDTA 2 mM, SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 0,5 % (v/v), glicerol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,5 mg/ml]. Las muestras se desnaturalizaron mediante incubación durante 5 minutos a 100 °C previo a la siembra.

Las fracciones purificadas de TRAP fueron mezcladas directamente con *buffer* de siembra para SDS-PAGE mientras que las fracciones S-16 y UB fueron precipitadas con dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) durante toda la noche a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 16.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras fueron resuspendidos en *buffer* de siembra para SDS-PAGE, y tratadas de la misma manera que los extractos de proteínas totales de raíz.

## **10.2. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La electroforesis de proteínas en presencia de SDS se llevó a cabo según el método descrito por (Laemmli 1970), empleando el sistema Miniprotean III de geles verticales (BioRad). Se utilizó una relación de acrilamida: bis-N',N'-metil-bisacrilamida 30 % (p/v): 0,8 % (p/v). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM pH 8,8 conteniendo SDS 0,1 % (p/v) y una concentración final de acrilamida de 12 % o 15 % (p/v), según el peso molecular relativo de las proteínas a separar. El gel de concentración se preparó en solución Tris-HCl 125 mM pH 6,8 conteniendo SDS 0,1 % (p/v) y acrilamida 5 % (p/v). En todos los casos se adicionó persulfato de amonio 0,1 % (p/v), como iniciador de la polimerización del gel y TEMED 0,4 % (v/v) como catalizador de la formación de radicales libres a partir del persulfato de amonio. La separación electroforética se realizó a temperatura ambiente en *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glicina 150 mM y SDS 0,1 % (p/v) aplicando una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel durante 1 hora y media aproximadamente.

## **10.3. Tinción con plata de las proteínas separadas por SDS-PAGE**

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron fijadas por incubación con una solución de etanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) durante 30 minutos. Luego el gel se incubó con una solución de glutaraldehído 10 % (v/v) durante 30 minutos. Se realizaron lavados con agua bidestilada incubando durante toda la noche. En el momento se preparó una solución de tinción de plata (NaOH 18,9 mM, hidróxido de amonio 207,2 mM, nitrato de plata 45,6 mM) y se incubó durante 6 minutos. Posteriormente se realizaron lavados con 500 ml de agua bidestilada. El gel se colocó en la solución de desarrollo conteniendo ácido cítrico 0,24 mM, formaldehído 0,018 % (v/v). Una vez desarrollada la tinción se detuvo la reacción con ácido acético 1 % (v/v) durante 30 minutos.

#### 10.4. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

Las proteínas, previamente separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham GE Life Science, Pittsburg, PA, USA) empleando una el sistema Miniprotean III (BioRad). La transferencia se realizó en una solución Tris-HCl 25 mM, glicina 150 mM pH 8,0, metanol 20 % (v/v) a 4 °C, aplicando un voltaje constante de 100 V durante 60 minutos. La transferencia de las proteínas a la membrana se verificó mediante la tinción con una solución de Rojo Ponceau S 2% (p/v) durante 5 minutos. Luego, se lavaron las membranas con agua destilada hasta la desaparición del color. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon por incubación durante 1 hora en *buffer* TBS-T [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM Tween 20 0,5 % (v/v)] conteniendo leche descremada en polvo 5 % (p/v). Alternativamente el bloqueo se realizó incubando toda la noche a 4 °C.

Las proteínas conteniendo el epítopo FLAG se detectaron utilizando una dilución 1:500 (v:v) del anticuerpo comercial  $\alpha$ -FLAG conjugado a la enzima HRP (*Horse Radish Peroxidase*) (No. de catálogo A8592 Sigma) en TBS-T. La membrana se incubó durante una hora con la solución de anticuerpo. Con esta solución se realizó la incubación de la membrana por una hora. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante cinco lavados de 10 minutos con *buffer* TBS-T. Este anticuerpo está conjugado a la enzima peroxidasa. La visualización se llevó a cabo utilizando el *kit* de quimioluminiscencia *ECL Western Blotting System* (Amersham GE Healthcare Life Sciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. Por último, las membranas se expusieron entre 5 y 30 minutos a placas autoradiográficas (*Kodak Medical X-ray Film General Purpose Green*).

Las proteínas de la subunidad menor del ribosoma S6 fueron detectadas utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -RPS6 cedido por el laboratorio de la Dr. Julia Bailey-Serres *Center for Plant Cell Biology* de la Universidad de California Riverside (Williams *et al.*, 2003). Se incubaron las membranas con una dilución 1:5000 (v:v) en TBS-T del anticuerpo durante una hora. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante cinco lavados de 10 minutos con *buffer* TBS-T. Luego se adicionó el anticuerpo secundario antiIgG de conejo conjugado con la enzima HRP (*ECL Western Blotting System*, Amersham) diluido 1:10.000 en la misma solución anterior. Al cabo de 2 horas de incubación a

temperatura ambiente se efectuaron dos lavados de 15 minutos con TBS-T. La detección se realizó mediante el *ECL Western Blotting System*, Amersham.

La proteína NF-YA1 fue detectada utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -NF-YA1 cedido por el laboratorio del Dr. Andreas Niebel del *Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes* CNRS-INRA Castanet-Tolosan (Combier *et al.*, 2008). Se incubaron las membranas con una dilución 1:2000 (v:v). Posteriormente, se utilizaron las mismas condiciones que para la detección de S6.

La cuantificación de las señales obtenidas se realizó utilizando el programa *ImageJ 1.42q* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## 11. Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizados para el análisis de secuencia

### 11.1. Herramientas bioinformáticas

**-BLASTP** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés para la búsqueda de proteínas homólogas en la base de datos del genoma de *M. truncatula*.

**-CLUSTALW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>): se realizó el alineamiento de secuencias a través del método *neighbor-joining* a partir de las proteínas homólogas obtenidas de otras especies.

**-BOXSHADE** ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)): este programa se utilizó para indicar el grado de conservación de aminoácidos a partir de los alineamientos resultantes del ClustalW.

**-MFOLD** (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>): Este programa se utilizó para predecir las estructuras secundarias formadas por las secuencias de interés. Se utilizaron los parámetros determinados.

**-MEME** (<http://meme.nbcr.net/meme/>): algoritmo utilizado para la búsqueda de motivos consenso en secuencias no traducidas. Se utilizaron los parámetros predeterminados del programa.

**-FIMO** (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/fimo.cgi>): este algoritmo se utilizó para detectar la presencia de motivos consenso específicos en un grupo de secuencias de interés que son suministradas al programa. Se utilizaron los parámetros predeterminados del programa.

## 11.2. Bases de datos de secuencias

-**Genoma de *M. truncatula*** <http://www.medicagohapmap.org/?genome>. Este sitio contiene la versión 3.5 del genoma.(Young *et al.*, 2011)

-**DFCI *gene index*** (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>). El proyecto *Gene Index* contiene secuencias expresadas de transcritos (ESTs) para diferentes especies de plantas. Esta base de datos contiene los modelos génicos posibles y sus variantes. Fue utilizado para la búsqueda de las secuencias no traducidas de los transcritos analizados.

-***Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA)** (<http://mtgea.noble.org/v3/>). Este sitio contiene un compendio de los perfiles de expresión para la mayoría de los genes de *M. truncatula*. Esta base de datos abarca diferentes estadios del desarrollo en los distintos órganos bajo distintos tratamientos. Affymetrix Medicago Gene Chip ® (Benedito *et al.*, 2008, He *et al.*, 2009)

-**miRBASE** (<http://www.mirbase.org/>). Base de datos utilizada para la búsqueda de secuencias de miRNAs y pre-miRNAs de *M. truncatula* (Kozomara and Griffiths-Jones 2011).

## 12. Microscopia confocal

Las raíces de plantas compuestas de tres semanas de *M. truncatula* transformadas con las construcciones p:FLAG-GFP-RPL18 se observaron en microscopio confocal Leica SP5 (Leica, Wetzla, Germany). Las muestras se excitaron con láser de Argón y la fluorescencia de GFP fue detectada en el rango de 498 a 545 nm. Las imágenes se tomaron con el programa *Leica Application Suite* (Leica).

## Bibliografía

- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G. and de Carvalho-Niebel, F.** (2007) AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell*, **19**, 2866-2885.
- Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ayax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J. and Cook, D.R.** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, **303**, 1364-1367.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J.C., Denarie, J. and 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.
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R. and Crespi, M.** (2010) Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *Plant Cell*, **22**, 2171-2183.
- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichante, J.L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R.L. and Frugier, F.** (2012) Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **24**, 3838-3852.
- Armache, J.P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., Marquez, V., Mielke, T., Thomm, M., Berninghausen, O., Beatrix, B., et al.** (2010) Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 19748-19753.
- Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P. and Gough, C.** (2006) The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.*, **142**, 265-279.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H.** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730-2741.
- Axtell, M.J.** (2013) Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annu Rev Plant Biol*, **64**, 137-159.
- Bailey-Serres, J. and Dawe, R.K.** (1996) Both 5' and 3' sequences of maize adh1 mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol*, **112**, 685-695.
- Bailey-Serres, J.** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci*, **4**, 142-148.
- Bailey-Serres, J., Sorenson, R. and Juntawong, P.** (2009) Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci.*, **14**, 443-453.
- Bailey-Serres, J.** (2013) Microgenomics: genome-scale, cell-specific monitoring of multiple gene regulation tiers. *Annu Rev Plant Biol*, **64**, 293-325.



- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. and Noble, W.S.** (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*, **37**, W202-208.
- Balagopal, V. and Parker, R.** (2009) Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 403-408.
- Barakat, A., Szick-Miranda, K., Chang, I.F., Guyot, R., Blanc, G., Cooke, R., Delseny, M. and Bailey-Serres, J.** (2001) The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiol*, **127**, 398-415.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. and Scheible, W.R.** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, **141**, 988-999.
- Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, F., Dattée, Y., Duc, G., Essad, S., Flament, P., Gallusci, P., Génier, G. and Guy, P.** (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **8**, 40-49.
- Bartel, D.P.** (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C.** (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11928-11933.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T. and Giraldez, A.J.** (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*, **336**, 233-237.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M.** (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, **334**, 1524-1529.
- Benaben, V., Duc, G., Lefebvre, V. and Huguet, T.** (1995) TE7, An Inefficient Symbiotic Mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiol*, **107**, 53-62.
- Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., et al.** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.*, **55**, 504-513.
- Bersoult, A., Camut, S., Perhald, A., Kereszt, A., Kiss, G.B. and Cullimore, J.V.** (2005) Expression of the *Medicago truncatula* DM12 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 869-876.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. and Benfey, P.N.** (2003) A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, **302**, 1956-1960.
- Birnbaum, K., Jung, J.W., Wang, J.Y., Lambert, G.M., Hirst, J.A., Galbraith, D.W. and Benfey, P.N.** (2005) Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat Methods*, **2**, 615-619.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. and Barker, D.G.** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 695-700.

- Boisson-Dernier, A., Andriankaja, A., Chabaud, M., Niebel, A., Journet, E.P., Barker, D.G. and de Carvalho-Niebel, F.** (2005) MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 1269-1276.
- Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combier, J.-P., Niebel, A., Crespi, M. and Frugier, F.** (2008) MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J.*, **54**, 876-887.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U. and Benfey, P.N.** (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, **318**, 801-806.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R.B. and Bailey-Serres, J.** (2005) Genome-wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in Arabidopsis Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation. *Annals of Botany*, **96**, 647-660.
- Branco-Price, C., Kaiser, K.A., Jang, C.J., Larive, C.K. and Bailey-Serres, J.** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **56**, 743-755.
- Brink, R.A. and Cooper, D.C.** (1938) Partial Self-Incompatibility in *Medicago Sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **24**, 497-499.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O.** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**, 1185-1190.
- Buchan, J.R. and Parker, R.** (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*, **36**, 932-941.
- Canfield, D.E., Glazer, A.N. and Falkowski, P.G.** (2010) The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, **330**, 192-196.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. and Denarie, J.** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**, 1647-1666.
- Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.C., Niebel, A., Oldroyd, G.E., Barker, D.G., Fournier, J. and de Carvalho-Niebel, F.** (2012) *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiol*, **160**, 2155-2172.
- Combier, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M. and Niebel, A.** (2006) MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev.*, **20**, 3084-3088.
- Combier, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A. and 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.
- Complainville, A., Brocard, L., Roberts, I., Dax, E., Sever, N., Sauer, N., Kondorosi, A., Wolf, S., Oparka, K. and Crespi, M.** (2003) Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *medicago* species. *Plant Cell*, **15**, 2778-2791.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E. and VandenBosch, K.** (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, **7**, 43-55.

- Cook, D.R.** (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 301-304.
- Crespi, M. and Galvez, S.** (2000) Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *J Plant Growth Regul*, **19**, 155-166.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E. and Kondorosi, A.** (1994) *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J*, **13**, 5099-5112.
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A. and Carrington, J.C.** (2010) Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 997-1003.
- Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F. and Barker, D.G.** (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep*, **22**, 46-51.
- Chang, I.F., Szick-Miranda, K., Pan, S. and Bailey-Serres, J.** (2005) Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of Arabidopsis cytosolic ribosomes. *Plant Physiol*, **137**, 848-862.
- Charon, C., Sousa, C., Crespi, M. and Kondorosi, A.** (1999) Alteration of *enod40* expression modifies *medicago truncatula* root nodule development induced by *sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, **11**, 1953-1966.
- Chen, X.** (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303**, 2022-2025.
- Chen, X.** (2012) Small RNAs in development - insights from plants. *Curr Opin Genet Dev*, **22**, 361-367.
- Chitwood, D.H., Nogueira, F.T., Howell, M.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C. and Timmermans, M.C.** (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev*, **23**, 549-554.
- d'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A. and Ratet, P.** (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, **34**, 95-106.
- De Luis, A., Markmann, K., Cognat, V., Holt, D.B., Charpentier, M., Parniske, M., Stougaard, J. and Voinnet, O.** (2012) Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, **160**, 2137-2154.
- de Sousa Araújo, S., Duque, A.S.R.L.A., dos Santos, D.M.M.F. and Fevereiro, M.P.S.** (2004) An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant cell, tissue and organ culture*, **78**, 123-131.
- Deal, R.B. and Henikoff, S.** (2011) Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Curr Opin Plant Biol*, **14**, 116-122.
- Debelle, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Prome, J.C. and Denarie, J.** (1996) The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol Microbiol*, **22**, 303-314.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**, 19-21.

- Denarie, J., Debelle, F. and Prome, J.C.** (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*, **65**, 503-535.
- Devers, E.A., Branscheid, A., May, P. and Krajinski, F.** (2011) Stars and Symbiosis: MicroRNA- and MicroRNA\*-Mediated Transcript Cleavage Involved in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiol.*, **156**, 1990-2010.
- Diaz, R.J. and Rosenberg, R.** (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, **321**, 926-929.
- Ding, L. and Han, M.** (2007) GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol.*, **17**, 411-416.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R.** (2012) miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, **336**, 237-240.
- Eckardt, N.A., Cominelli, E., Galbiati, M. and Tonelli, C.** (2009) The future of science: food and water for life. *Plant Cell*, **21**, 368-372.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R. and Long, S.R.** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, **85**, 673-681.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. and Kiss, G.B.** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, **417**, 962-966.
- Eulalio, A., Triteschler, F. and Izaurralde, E.** (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, **15**, 1433-1442.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W.** (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, **79**, 351-379.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H.** (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
- Fahraeus, G.** (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 374-381.
- Fang, Y. and Hirsch, A.M.** (1998) Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol*, **116**, 53-68.
- Fang, Y. and Spector, D.L.** (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol*, **17**, 818-823.
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L. and Link, A.J.** (2006) Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.*, **20**, 1294-1307.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A. and Paz-Ares, J.** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, **39**, 1033-1037.
- Gallie, D.R. and Young, T.E.** (1994) The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions on expression. *Plant Physiol*, **106**, 929-939.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Höhmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H. and Huijser, P.** (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of

- the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J.*, **49**, 683-693.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernie, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S.A., Ratet, P., Mysore, K.S., Denarie, J., Schultze, M. and Oldroyd, G.E.** (2012) A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol*, **22**, 2236-2241.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. and Frugier, F.** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, **18**, 2680-2693.
- Graham, P.H. and Vance, C.P.** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, **131**, 872-877.
- Grant, C.E., Bailey, T.L. and Noble, W.S.** (2011) FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, **27**, 1017-1018.
- Gresshoff, P.M.** (2003) Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. *Genome Biol*, **4**, 201.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L. and Parniske, M.** (2010) NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell*, **22**, 2509-2526.
- Grunewald, W., van Noorden, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Gheysen, G. and Mathesius, U.** (2009) Manipulation of auxin transport in plant roots during Rhizobium symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell*, **21**, 2553-2562.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P.** (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**, 835-840.
- Halbeisen, R.E. and Gerber, A.P.** (2009) Stress-Dependent Coordination of Transcriptome and Translatome in Yeast. *PLoS Biol.*, **7**, e105.
- Halbeisen, R.E., Scherrer, T. and Gerber, A.P.** (2009) Affinity purification of ribosomes to access the translatome. *Methods*, **48**, 306-310.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N.** (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1093-1098.
- Handberg, K. and Stougaard, J.** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, **2**, 487-496.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N. and Yanai, I.** (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*, **2**, 666-673.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M. and Imaizumi-Anraku, H.** (2010) A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J*, **63**, 141-154.
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y. and Udvardi, M.K.** (2009) The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics*, **10**, 441.
- Heidstra, R., Welch, D. and Scheres, B.** (2004) Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev*, **18**, 1964-1969.
- Hellmann, H. and Estelle, M.** (2002) Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, **297**, 793-797.

- Hirsch, A.M.** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, **122**, 211-237.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E.** (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **21**, 545-557.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D. and Brown, P.O.** (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol*, **6**, e255.
- Hogslund, N., Radutoiu, S., Krusell, L., Voroshilova, V., Hannah, M.A., Goffard, N., Sanchez, D.H., Lippold, F., Ott, T., Sato, S., Tabata, S., Liboriussen, P., Lohmann, G.V., Schauser, L., Weiller, G.F., et al.** (2009) Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of lotus japonicus mutant and wild-type plants. *PLoS One*, **4**, e6556.
- Horváth, B., Yeun, L.H., Domonkos, Á., Halász, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miró, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Ané, J.-M., Oldroyd, G.E.D. and Kaló, P.** (2011) *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **24**, 1345-1358.
- Hulzink, R.J., de Groot, P.F., Croes, A.F., Quaedvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J. and Van Herpen, M.M.** (2002) The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiol*, **129**, 342-353.
- Hummel, M., Cordewener, J.H., de Groot, J.C., Smeekens, S., America, A.H. and Hanson, J.** (2012) Dynamic protein composition of Arabidopsis thaliana cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MSE proteomics. *Proteomics*, **12**, 1024-1038.
- Imlau, A., Truernit, E. and Sauer, N.** (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, **11**, 309-322.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Jr., Yates, J.R., 3rd, Schieltz, D. and Sachs, A.B.** (2002) One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA*, **8**, 948-958.
- Ingolia, N.T., Brar, G.A., Rouskin, S., McGeachy, A.M. and Weissman, J.S.** (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*, **7**, 1534-1550.
- Jackson, S.D. and Hong, Y.** (2012) Systemic movement of FT mRNA and a possible role in floral induction. *Front Plant Sci*, **3**, 127.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Li, Y.F., Shukla, L.I., Matts, J., Hoyt, P., Macmil, S.L., Wiley, G.B., Roe, B.A., Zhang, W. and Sunkar, R.** (2009) Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytol*, **184**, 85-98.
- Janas, M.M., Wang, E., Love, T., Harris, A.S., Stevenson, K., Semmelmann, K., Shaffer, J.M., Chen, P.H., Doench, J.G., Yerramilli, S.V., Neuberg, D.S., Iliopoulos, D., Housman, D.E., Burge, C.B. and Novina, C.D.** (2012) Reduced expression of ribosomal proteins relieves microRNA-mediated repression. *Mol Cell*, **46**, 171-186.
- Jenkinson, D.** (2001) The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant and Soil*, **228**, 3-15.
- Jiao, Y. and Meyerowitz, E.M.** (2010) Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 419.

- Jones, A.M., Thomas, V., Bennett, M.H., Mansfield, J. and Grant, M.** (2006) Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol*, **142**, 1603-1620.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X. and Chiang, V.L.** (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol*, **35**, 993-1001.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. and Barker, D.G.** (1994) *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J*, **6**, 241-249.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G. and Gianinazzi-Pearson, V.** (2001) *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 737-748.
- Juntawong, P. and Bailey-Serres, J.** (2012) Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, **3**, 66.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E.** (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, **308**, 1786-1789.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., *et al.*** (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 359-364.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, **7**, 193-195.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J.** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 460-465.
- Kawaguchi, R., Williams, A., Bray, E. and Bailey-Serres, J.** (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 221-229.
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A. and Bailey-Serres, J.** (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **38**, 823-839.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J.** (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 955-965.
- Kawamata, T., Seitz, H. and Tomari, Y.** (2009) Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 953-960.
- Kerenyi, Z., Merai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., Barta, E., Nagy, F. and Silhavy, D.** (2008) Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J*, **27**, 1585-1595.
- Kim, D.W., Lee, S.H., Choi, S.B., Won, S.K., Heo, Y.K., Cho, M., Park, Y.I. and Cho, H.T.** (2006) Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *Plant Cell*, **18**, 2958-2970.
- Kiss, E., Oláh, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbóla, A., Lózsá, A., Kontár, K., Middleton, P., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D. and Endre, G.**

- (2009) LIN, a novel type of U-Box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol.*, **151**, 1239-1249.
- Klaus-Heisen, D., Nurisso, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Mbengue, M., Camut, S., Timmers, T., Pichereaux, C., Rossignol, M., Gadella, T.W., Imberty, A., Lefebvre, B. and Cullimore, J.V.** (2011) Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *J Biol Chem*, **286**, 11202-11210.
- Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M. and Kondorosi, A.** (2005) Ubiquitin-Mediated Proteolysis. To Be in the Right Place at the Right Moment during Nodule Development. *Plant Physiology*, **137**, 1197-1204.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S.** (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, **39**, D152-157.
- Kunitomo, H., Uesugi, H., Kohara, Y. and Iino, Y.** (2005) Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails. *Genome Biol*, **6**, R17.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M. and Niebel, A.** (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci*, **18**, 157-166.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crete, P., Voinnet, O. and Robaglia, C.** (2009) Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *Plant Cell*, **21**, 1762-1768.
- Lauria, M. and Rossi, V.** (2011) Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1809**, 369-378.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E.** (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, **11**, 204-220.
- Lawlor, D.W., Lemaire, G. and Gastal, F.** (2001) Nitrogen, plant growth and crop yield. In *Plant nitrogen*: Springer, pp. 343-367.
- Le Signor, C., Savoie, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J. and Thompson, R.** (2009) Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J*, **7**, 430-441.
- Lee, D.Y., Deng, Z., Wang, C.H. and Yang, B.B.** (2007) MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20350-20355.
- Lelandais-Briere, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Gouzy, J. and Crespi, M.** (2009) Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell*, **21**, 2780-2796.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhou, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.-P., Ané, J.-M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debelle, F.** (2004) A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, **303**, 1361-1364.
- Li, H., Deng, Y., Wu, T., Subramanian, S. and Yu, O.** (2010) Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiol.*, **153**, 1759-1770.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., Zhang, F., Raikhel, N., Jiang, L. and Chen, X.** (2013) MicroRNAs Inhibit the



- Translation of Target mRNAs on the Endoplasmic Reticulum in Arabidopsis. *Cell*, **153**, 562-574.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, **302**, 630-633.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2005) Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **102**, 10375-10380.
- Limpens, E., Moling, S., Hooiveld, G., Pereira, P.A., Bisseling, T., Becker, J.D. and Kuster, H.** (2013) Cell- and Tissue-Specific Transcriptome Analyses of *Medicago truncatula* Root Nodules. *PLoS ONE*, **8**, e64377.
- Liu, Y., Wang, Y., Zhu, Q.H. and Fan, L.** (2013) Identification of phasiRNAs in wild rice (*Oryza rufipogon*). *Plant Signal Behav*, **8**.
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C. and Clarke, J.** (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep*, **7**, 1052-1058.
- Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Penuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K.A. and VandenBosch, K.A.** (2006) Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, **140**, 221-234.
- Lorkovic, Z.J.** (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci*, **14**, 229-236.
- Mace, D.L., Lee, J.Y., Twigg, R.W., Colinas, J., Benfey, P.N. and Ohler, U.** (2006) Quantification of transcription factor expression from Arabidopsis images. *Bioinformatics*, **22**, e323-331.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson C.W., James E.K. and Stougaard, J.** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, **1**, Article number: 10, doi:10.1038/ncomms1009
- Manjunath, S., Williams, A.J. and Bailey-Serres, J.** (1999) Oxygen deprivation stimulates Ca<sup>2+</sup>-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J*, **19**, 21-30.
- Manni, I., Caretti, G., Artuso, S., Gurtner, A., Emiliozzi, V., Sacchi, A., Mantovani, R. and Piaggio, G.** (2008) Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 5203-5213.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. and Maizel, A.** (2010) miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell*, **22**, 1104-1117.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J. and Nilsen, T.W.** (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1102-1107.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R., Spaink, H.P., Of Sautter, C., Rolfe, B.G. and Djordjevic, M.A.** (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J*, **14**, 23-34.
- Mathesius, U., Charon, C., Rolfe, B.G., Kondorosi, A. and Crespi, M.** (2000) Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell

- divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 617-628.
- Mathesius, U.** (2008) Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development? *Functional Plant Biology*, **35**, 651-668.
- Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., Delacroix, H., Duc, G., Ratet, P., Aggerbeck, L., Kondorosi, E., et al.** (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One*, **5**, e9519.
- Mazziotta, L., Reynoso, M.A., Aguilar, O.M., Blanco, F.A. and Zanetti, M.E.** (2012) Transcriptional and functional variation of NF-YC1 in genetically diverse accessions of *Phaseolus vulgaris* during the symbiotic association with *Rhizobium etli*. *Plant Biol (Stuttg)*.
- Meade, H.M., and Signer, E. R.** (1977) Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 2076-2078.
- Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E. and Bushell, M.** (2013) Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*, **340**, 82-85.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R. and Ané, J.-M.** (2007) A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **20**, 912-921.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., et al.** (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell*, **19**, 1221-1234.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. and Long, S.R.** (2004) A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 4701-4705.
- Moeller, J.R., Moscou, M.J., Bancroft, T., Skadsen, R.W., Wise, R.P. and Whitham, S.A.** (2012) Differential accumulation of host mRNAs on polyribosomes during obligate pathogen-plant interactions. *Mol Biosyst*, **8**, 2153-2165.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F. and Gamas, P.** (2011) Transcription Reprogramming during Root Nodule Development in *Medicago truncatula*. *PLoS One*, **6**, e16463.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. and Hentze, M.W.** (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*, **2**, 383-388.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J. and Imberthy, A.** (2006) LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitoooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology*, **16**, 801-809.

- Mustroph, A., Juntawong, P. and Bailey-Serres, J.** (2009a) Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods Mol. Biol.*, **553**, 109-126.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T. and Bailey-Serres, J.** (2009b) Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 18843-18848.
- Mustroph, A., Lee, S.C., Oosumi, T., Zanetti, M.E., Yang, H., Ma, K., Yaghoubi-Masihi, A., Fukao, T. and Bailey-Serres, J.** (2010) Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol.*, **152**, 1484-1500.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Girke, T. and Bailey-Serres, J.** (2013) Isolation and analysis of mRNAs from specific cell types of plants by ribosome immunopurification. *Methods Mol Biol*, **959**, 277-302.
- Nottrott, S., Simard, M.J. and Richter, J.D.** (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1108-1114.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- Oldroyd, G.E. and Downie, J.A.** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol*, **59**, 519-546.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S. and Downie, J.A.** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 119-144.
- Onouchi, H., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Kawasaki, D., Nagami-Yamashita, Y., Murota, K., Kezuka-Hosomi, A., Chiba, Y. and Naito, S.** (2008) Nascent Peptide-Mediated Translation Elongation Arrest of *Arabidopsis thaliana* CGS1 mRNA Occurs Autonomously. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 549-556.
- Ortega, J.L., Wilson, O.L. and Sengupta-Gopalan, C.** (2012) The 5' untranslated region of the soybean cytosolic glutamine synthetase beta(1) gene contains prokaryotic translation initiation signals and acts as a translational enhancer in plants. *Mol Genet Genomics*, **287**, 881-893.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S.** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3691-3696.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X.** (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, **12**, 1484-1495.
- Parniske, M.** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*, **6**, 763-775.
- Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A.B., Venkateshwaran, M., Riely, B.K., Otegui, M.S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M.G., Cook, D.R., Sanders, D., Oldroyd, G.E., Downie, J.A. and Ane, J.M.** (2007) The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol*, **145**, 192-203.
- Penmetza, R.V. and Cook, D.R.** (2000) Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **123**, 1387-1398.
- Pislariu, C.I., Murray, J.D., Wen, J., Cosson, V., Muni, R.R., Wang, M., Bedito, V.A., Andriankaja, A., Cheng, X., Jerez, I.T., Mondy, S., Zhang, S., Taylor, M.E., Tadege, M., Ratet, P., *et al.*** (2012) A *Medicago truncatula* tobacco

- retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol*, **159**, 1686-1699.
- Pitto, L., Gallie, D.R. and Walbot, V.** (1992) Role of the Leader Sequence during Thermal Repression of Translation in Maize, Tobacco, and Carrot Protoplasts. *Plant Physiol*, **100**, 1827-1833.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M. and Frugier, F.** (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J*, **65**, 622-633.
- Powlson, D.S., Addiscott, T.M., Benjamin, N., Cassman, K.G., de Kok, T.M., van Grinsven, H., L'Hirondel, J.L., Avery, A.A. and van Kessel, C.** (2008) When does nitrate become a risk for humans? *J Environ Qual*, **37**, 291-295.
- Quandt, H.J., Pühler, A., and Broer, I.** (1993) Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **6**, 699-706.
- Raftery, A.E., Li, N., Sevcikova, H., Gerland, P. and Heilig, G.K.** (2012) Bayesian probabilistic population projections for all countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 13915-13921.
- Rajagopalan, L., Patel, N., Madabushi, S., Goddard, J.A., Anjan, V., Lin, F., Shope, C., Farrell, B., Lichtarge, O., Davidson, A.L., Brownell, W.E. and Pereira, F.A.** (2006) Essential helix interactions in the anion transporter domain of prestin revealed by evolutionary trace analysis. *J Neurosci*, **26**, 12727-12734.
- Ramachandran, V. and Chen, X.** (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science*, **321**, 1490-1492.
- Ramos, J. and Bisseling, T.** (2003) A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot*, **54**, 2245-2250.
- Ribeiro, D.M., Araujo, W.L., Fernie, A.R., Schippers, J.H. and Mueller-Roeber, B.** (2012) Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, **63**, 2769-2786.
- Rival, P., de Billy, F., Bono, J.J., Gough, C., Rosenberg, C. and Bensmihen, S.** (2012) Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. *Development*, **139**, 3383-3391.
- Rolfe, B.G. and Gresshoff, P.** (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**, 297-319.
- Roy, P.J., Stuart, J.M., Lund, J. and Kim, S.K.** (2002) Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **418**, 975-979.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarenghi, E. and Duc, G.** (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula*(Gaertn.) after -ray mutagenesis. *Plant Science*, **111**, 63-71.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., et al.** (2007) NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*, **19**, 610-624.
- Sambrook, J., Russel, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbour.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. and Stougaard, J.** (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, **402**, 191-195.

- Shimomura, K., Nomura, M., Tajima, S. and Kouchi, H.** (2006) LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 1572-1581.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, **308**, 1789-1791.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C. and Bisseling, T.** (2007) Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.*, **145**, 183-191.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G.** (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731-745.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A. and Hayashi, M.** (2013) NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet*, **9**, e1003352.
- Suzaki, T., Kim, C.S., Takeda, N., Szczyglowski, K. and Kawaguchi, M.** (2013) TRICOT encodes an AMP1-related carboxypeptidase that regulates root nodule development and shoot apical meristem maintenance in *Lotus japonicus*. *Development*, **140**, 353-361.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P. and Mysore, K.S.** (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, **54**, 335-347.
- Takayama, J., Faumont, S., Kunitomo, H., Lockery, S.R. and Iino, Y.** (2010) Single-cell transcriptional analysis of taste sensory neuron pair in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, **38**, 131-142.
- Tenenbaum, S.A., Carson, C.C., Lager, P.J. and Keene, J.D.** (2000) Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14085-14090.
- Tenenbaum, S.A., Lager, P.J., Carson, C.C. and Keene, J.D.** (2002) Ribonomics: identifying mRNA subsets in mRNP complexes using antibodies to RNA-binding proteins and genomic arrays. *Methods*, **26**, 191-198.
- Thermann, R. and Hentze, M.W.** (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, **447**, 875-878.
- Timmers, A.C., Auriac, M.C. and Truchet, G.** (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, **126**, 3617-3628.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., et al.** (2006) Deregulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, **441**, 1153-1156.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. and Stougaard, J.** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, **315**, 104-107.
- Trieu, A.T. and Harrison, M.J.** (1996) Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*, **16**, 6-11.
- Turner, M., Nizampatnam, N.R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S., Yu, O. and Subramanian, S.** (2013) Ectopic expression

- of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiol.*
- van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J. and Kijne, J.W.** (1992) Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, **257**, 70-72.
- van Noorden, G.E., Kerim, T., Goffard, N., Wiblin, R., Pellerone, F.I., Rolfe, B.G. and Mathesius, U.** (2007) Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol*, **144**, 1115-1131.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, research0034-research0034.0011.
- Voinnet, O.** (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669-687.
- Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J. and Long, S.R.** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13407-13412.
- Wan, X., Hontelez, J., Lillo, A., Guarnerio, C., van de Peut, D., Fedorova, E., Bisseling, T. and Franssen, H.** (2007) *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development. *J Exp Bot*, **58**, 2033-2041.
- Wasson, A.P., Pellerone, F.I. and Mathesius, U.** (2006) Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*, **18**, 1617-1629.
- Weber, C., Nover, L. and Fauth, M.** (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J*, **56**, 517-530.
- Wilson, D.N. and Doudna Cate, J.H.** (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Williams, A.J., Werner-Fraczek, J., Chang, I.F. and Bailey-Serres, J.** (2003) Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiol.*, **132**, 2086-2097.
- Yan, J., Gu, Y., Jia, X., Kang, W., Pan, S., Tang, X., Chen, X. and Tang, G.** (2012) Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 415-427.
- Yang, L., Wu, G. and Poethig, R.S.** (2012) Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 315-320.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. and Poethig, R.S.** (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **19**, 2164-2175.
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Bedito, V.A., Mayer, K.F., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D.R., Meyers, B.C., Spannagl, M., et al.** (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, **480**, 520-524.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. and Chen, X.** (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, **307**, 932-935.

- Zanetti, M.E., Chang, I.F., Gong, F., Galbraith, D.W. and Bailey-Serres, J.** (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol.*, **138**, 624-635.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M. and Aguilar, O.M.** (2010) A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell*, **22**, 4142-4157.
- Zhai, J., Jeong, D.-H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., González, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J., et al.** (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.*, **25**, 2540-2553.
- Zuker, M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.

## Anexo I. Secuencias

### 1. Construcciones para expresar FLAG:RPL18

En gris se indica la secuencia del promotor, en naranja la región 5' UTR, en verde la región que codifica el epítipo de histidinas, en azul las secuencias de glicinas, en rojo indica el péptido FLAG y en negro la secuencia de RPL18 de *M. truncatula*, en violeta el codón Stop.

>p35S:FLAG-RPL18\_seq\_3`OCS

```
GGAAACTCTCGGATCATGCCAGCTATCTGTCACTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCT
ACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGA
TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCITCAAAGCAAGTGGAT
TGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCITCCTCTA
TATAAGGAAGTTCATTTCAITTTGGAGAGGACACGCTCGAGTATAAGAGCTCTATTTTTACAACAATTACC
ACAACAACAACAACAACAACAATTACAATTACAATTACAATTACCATGGGACATCACCATCATC
ACCATGGTGGAGGTGATTATAAGGATGATGATGATAAGGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGA
TCCGGTATCGATCTTAAGGCAGGAGGTAAGAACAAAAAACAAAAAGAACAGCACCAAA
ATCCAATGATATCTATCTCAAGCTTTTGGTCAAGCTTTATCGGTTCTTTGTTTCGGAGAA
CTGGCAGCAATTTCAATGCTGTTATACTCAAGAGGTTGTTTATGAGCAAGGTTAACAAA
CCTCCACTATCTTTGTCAAGGTTGATCAAGTATAACCAATGGGAAGGAAGGTAAAATTGC
TGTCGTGGTGGGGCTATAACTGATGATGTCCGTGTTAATGAAGTTCAGCCATAAAGG
TTACAGCACTCAGGTTTACCGAGAGGGCAAGGGCAAGAATAGAAAGTGCTGGTGGTGAA
TGCTTGACATTCGATCAGTTGGCTCTTAGGGCCCCCTCTGGGACAAAACACGGTTCTTCT
TAGAGGCCCAAAGAATGCTCGTGAAGCAGTGAAGCACTTTGGTCTGCTCCTGGTGTCC
CACAAAGCCACACCAACCTTATGTTAGAGGAAAGTCAAGGAAGATCGAGAAGGCTAGA
GGAAAGAGGAAGAGCAGAGGATTCAGAGTTTGA TCTAGAGTCTTGCTTTAAT
```

>pSUC2:FLAG-RPL18\_seq\_3`OCS

```
ACTACAACCACCGCAACAACCACCAAAAAACCCCTCTCAAAGAAATTTCTTTTTTTTTCTTACTTTCTTGGTT
TGTCAAATACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATCGGTACCTATTTTTACAACAATTACCAACAACAA
CAACAACAACAACAACAATTACAATTACAATTACAATTACCATGGGACATCACCATCATCACCATGG
TGGAGGTGATTATAAGGATGATGATGATAAGGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGATCCGGTA
TCGATCTTAAGGCAGGAGGTAAGAACAAAAAACAAAAAGAACAGCACCAAAATCCAAT
GATATCTATCTCAAGCTTTTGGTCAAGCTTTATCGGTTCTTTGTTTCGGAGAACTGGCAG
CAATTTCAATGCTGTTATACTCAAGAGGTTGTTTATGAGCAAGGTTAACAAACCTCCAC
TATCTTTGTCAAGGTTGATCAAGTATAACCAATGGGAAGGAAGGTAAAATTGCTGTCTGTG
GTGGGGGCTATAACTGATGATGTCCGTGTTAATGAAGTTCAGCCATAAAGGTTACAGC
ACTCAGTTTTACCGAGAGGGCAAGGGCAAGAATAGAAAGTGCTGGTGGTGAATGCTTGA
CATTTCGATCAGTTGGCTCTTAGGGCCCCCTCTGGGACAAAACACGGTTCTTCTTAGAGGC
CCAAAGAATGCTCGTGAAGCAGTGAAGCACTTTGGTCTGCTCCTGGTGTCCCACAAAG
CCACACCAACCTTATGTTAGAGGAAAGTCAAGGAAGATCGAGAAGGCTAGAGGAAAGA
GGAAGAGCAGAGGATTCAGAGTTTGA TCTAGAGTCTGCTAAATAATTTGG
```



>pCO2:FLAG-RPL18\_seq\_3`OCS

AGTGTAACGCAATAAAAATGCTCCAATATTTCTCGAAGTTGGAACATCTTCTTTTTTCTTCATTTTCTTGCTTACACATGTTTCGTTTGTACGTACCATAACAAAATAATCAAATCTACTACACTTATAAACACTATAACCTATTTATGTGCGTAGTGGTTAACACCCATACAAGAGTACCGGGTACATTTAAGCTTCAACTATATATTTGCA TGTTATTTGCCAAAAGGATTTGACAATAATGCAACAAGAGTTTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTC TTGTACAAAAGTGGTGATCGGTACCTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACATTA CAATTACATTTACAATTACCATGGGACATCACCATCATCACCATGGTGGAGGTGATTATAAG GATGATGATGATAAGGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGATCCGGTATCGATCTTAAGGCAGC AGGTAAGAACAACAAAAACAACAAAAGAACAGCACCAAAATCCAATGATATCTATCTCAAGC TTTTGGTCAAGCTTTATCGGTTCCCTTGTTCGGAGAAGTGGCAGCAATTTCAATGCTGTT AACTCAAGAGGTTGTTTATGAGCAAGGTTAACAACCTCCACTATCTTTGTCAAGGTT GATCAAGTATACCAATGGGAAGGAAGGTAATAATTGCTGTCTGTTGGTGGGGGCTATAACTG ATGATGTCCGTGTTAATGAAGTTCAGCCATAAAGGTTACAGCACTCAGGTTTACCGAG AGGGCAAGGGCAAGAATAGAAAGTGCTGGTGGTGAATGCTTGACATTCGATCAGTTGGC TCTTAGGGCCCTCTGGGACAAAACACGGTCTTCTTAGAGGCCCAAAGAATGCTCGTG AAGCAGTGAAGCACTTTGGTCTGCTCCTGGTGTCCACAAAGCCACACCAAACCTTAT GTTAGAGGAAAGTCAAGGAAGATCGAGAAGGCTAGAGGAAAGAGGAAGAGCAGAGGATT CAGAGTTTGA TCTAGAGTC

>pEXP7:FLAG-RPL18\_seq\_SEQPGAT

ATATCATATGATTAAACATGTTGGCAGACTTTATATTTTTGTACAGTAACACCATTTTCTTTACTTATTT AAGAAAATACGGTAATGATATAATATTCCTGGATCATTCTCCATGTAACACTACATCATTGGCTAGCAATACT GTTTCTAGACAATAACTTAAACAAAAAATATACAAACAAACAAACAAACATCAGTAATATTGTTGACTAGCA AAGATAGAGACATATTCGTGGGATTCACGAAGGCAACTTCTTTCAATTAGTGACGTGCAACTGAAATTGA AAGTTATATATAAGAACACATGTACAAGTACAAATCAATGAGCGAGCTCTATTTTTACAACAATTACCAA CAACAACAACAACAACAACAATTACAATTACAATTACCATGGGACATCACCATCATCAC CATGGTGGAGGTGATTATAAGGATGATGATGATAAGGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGATC CGGTATCGATCTTAAGGCAGGAGGTAAGAACAACAAAAACAACAAAAGAACAGCACCAAAAT CCAATGATATCTATCTCAAGCTTTTGGTCAAGCTTTATCGGTTCTTGTTCGGAGAAGT GGCAGCAATTTCAATGCTGTTATACTCAAGAGGTTGTTTATGAGCAAGGTTAACAACCC TCCACTATCTTTGTCAAGGTTGATCAAGTATACCAATGGGAAGGAAGGTAATAATTGCTG TCGTGGTGGGGGCTATAACTGATGATGTCCGTGTTAATGAAGTTCAGCCATAAAGGTT ACAGCACTCAGGTTTACCGAGAGGGCAAGGGCAAGAATAGAAAGTGCTGGTGGTGAATG CTTGACATTCGATCAGTTGGCTCTTAGGGCCCTCTGGGACAAAACACGGTCTTCTTTA GAGGCCCAAAGAATGCTCGTGAAGCAGTGAAGCACTTTGGTCTGCTCCTGGTGTCCCA CAAAGCCACACCAAACCTTATGTTAGAGGAAAGTCAAGGAAGATCGAGAAGGCTAGAGG AAAGAGGAAGAGCAGAGGATTCAGAGTTTGA TCTAGAGTCCTGCTTTA

## 2. Construcción para expresar pEXP7:FLAG-GFP-RPL18

En naranja se indica parte de la región 5` UTR , en verde oscuro la región que codifica el epítotope de histidinas, en azul la secuencias de glicinas, en rojo indica el péptido FLAG, en verde claro la secuencia que codifica GFP y en negro parte de la secuencia de RPL18 de *M. truncatula*.

>pEXP7:FLAG-RPL18\_seq\_RPL18\_Rev

ATTACATTTACAATTACCATGGGACATCACCATCATCACCATGGTGGAGGTGATTATAAGGATGATGATGATAAGGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTA AACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACC CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTTGCTGGAGTT CGTGACCGCCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGA TCCGGTATCG ATCTTAAGGCAGGAGGT

## 3. Secuencia de productos de amplificación mediante el sistema miScript

En rojo se indica la secuencia del sRNA amplificado, en verde la secuencia del primer universal incorporado por la transcripción reversa y en negrita corresponde a la región de poliadenilación por el sistema miScript.

>pGEM-T-Easy-miR166\_M13F

GATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAA TCGAGCACCAGTTACGCATGCCGAGGTGCAGTTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGG GAATGAAGCCTGGTCCGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATAT GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA GCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT CCACACAACATAACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG CTAACCTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCTGTGCT GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGC TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGT ATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

>pGEM-T-Easy-miR69\_ M13F

GATTGGGCCCCGACGTTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAA  
TCGAGCACCAGTTACGCATGCCGAGGTCGACTTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCG  
GCAAGTCATCCTTGGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT  
GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA  
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT  
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG  
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGT  
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC  
TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGT  
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

>pGEM-T-Easy-miR171\_ M13F

GATTGGGCCCCGACGTTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTGA  
GCCGAATCAATCACTCTAAAAAAAAAAAAAAAAATCTAGGAAGTCGACCTCGGCATGCG  
TAACTGGTGCTCGATTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATG  
GGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAG  
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTC  
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC  
TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTG  
CCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCT  
CTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA  
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

>pGEM-T-Easy-miR390\_ M13F

GATTGGGCCCCGACGTTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAA  
TCGAGCACCAGTTACGCATGCCGAGGTCGACTTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG  
GGGGGGGGGGGCGCTATCCCTCCTGAGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCA  
GGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT  
GTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT  
CCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGC  
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGG  
GAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG  
CGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCT  
GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

>pGEM-T-Easy-tasiARFs\_ M13F

GATTGGGCCCCGACGTTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAA  
TCGAGCACCAGTTACGCATGCCGAGGTCGACTTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA  
GGTCTTACAAGTCAAGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATA  
TGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAAT  
AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT  
TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA  
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCG  
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCG  
CTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGG  
TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

## Anexo II. Primers

Identificador del gen <sup>a</sup>	Nombre del primer	Secuencia del primer	Referencia
Medtr5g019040.1	MtNFP-F MtNFP-R	TCTCATGCTCTTTTCTTGTCCTCA CTCGGCTTCTATGTTACTGGCTTT	(Arrighi <i>et al.</i> , 2006)
Medtr5g086130.1	MtLYK3-F MtLYK3-R	TGCTAAGGGTTCAGCTGTTGGTA AAATGCCCTAGAAAGTTTGTGGAAG	(Limpens <i>et al.</i> , 2005)
Medtr2g008050.1	MtACT11-F MtACT11-R	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG ACCCAAAAGCATCAAATAAATAAGTCAACC	(Ariel <i>et al.</i> , 2010)
Medtr4g097170.1	MtHIS3-F MtHIS3-R	ATTCCAAAAGGGGCTGCATA CTTTGCTTGGTGTGTTTAGATGG	(Ariel <i>et al.</i> , 2010)
Medtr1g090320.1	MtLIN9-F MtLIN-RTR	TGGTTGCTCTGGTTACAGC GTGAAAATATCTTTCCTGCGGTTG	Este trabajo
Medtr2g005870.1	MtDMI1-F MtDMI1-R	GTTGCTGCAGATGGAGGGAAGAT GCGCCAGCCACAAAACAGTAT	(Limpens <i>et al.</i> , 2005)
Medtr5g030920.1	MtDMI2-F MtDMI2-R	TGGACCCCTTTTGAATGCCTATG TCCACTCCAACCTCCAATGCCTC	(Limpens <i>et al.</i> , 2005)
Medtr8g043970.1	MtDMI3-F MtDMI3-R	TCATTGATCCCTTTTGGCTTCTCGT GATGCTACTTCTCTTTGCTGATGC	(Lévy <i>et al.</i> , 2004)
Medtr5g026850.1	MtIPD3-F MtIPD3-R	GCGCTCAAGAAAAATGGCTGAAGC GCTTTAGTGATCGAACTTCTTCTCAAGG	(Messinese <i>et al.</i> , 2007)
Medtr8g106150.1	MtCRE1-F MtCRE1-R	GCACCACCTTTGGCTTCTAAG CCACTAAGTAGCGGCCTTTTCG	Este trabajo
Medtr1g056530.1	MtNF-YA1-F MtNF-YA1-R	AAAATATGGCTATGCAACCTGTTTA CAACTGACATCTTACAATCATCTGG	(Combiar <i>et al.</i> , 2006)
Medtr7g113680.1	MtNF-YC1-F MtNF-YC1-R	CCTGTGATGGACCCAAAACA CACCAATGGAACAGTTTCACC	Este trabajo
Medtr7g085810.1	MtERN1-F MtERN1-R	GGAAGATGGTGCTGTTGCTT TGTTGGATTGTGAACCTGACTC	(Andriankaja <i>et al.</i> , 2007)
Medtr8g020840.1	MtNSP1-F MtNSP1-R	GTGGTTAGAAAATCTGGTGGG GTGTCAATGCTCGAAGACCA	(Smit <i>et al.</i> , 2005)
Medtr3g072710.1	MtNSP2-F MtNSP2-R	GACACACTGCTGCTTTCCA AATGCCGTTATCCGAAGATG	Este trabajo. (Gonzalez-Rizzo <i>et al.</i> , 2006)
Medtr5g099060.1	MtNIN-F MtNIN-R	GAAGCCATGACTATCCGCGTC CACCAACCTGATGCACCAC	(Smit <i>et al.</i> , 2007)
X80264	MtENOD40-F MtENOD40-R	AGGAATCCATTGCCTTTTTGTGAC CCCTACACACTCTCCCTCCA	(Gonzalez-Rizzo <i>et al.</i> , 2006)
X68032.1	MtENOD12-F MtENOD12-R	GGAAGTCTTAGTTAGTAATGCTTTGTTGTAT TATGCTATGCTCTTGACCTGGC	Este trabajo
Medtr8g100050.1	MtARF2-F MtARF2-R	TCGTCAAAAAGTAAGCATGGACCC CAGGAGTCCACGCAACAGACTTC	Este trabajo
Medtr2g014770.1	MtARF3-F MtARF3-R	CACTTCAGCAAAGCTAGAATTTCCA TTTGAACCAGGATAGCACCTCCCT	Este trabajo
Medtr4g060460.1	MtARF4-F MtARF4-R	AGAAAACGGTCTTCTGAAATCAAT TCATTTTGAATCTGTCCCTATGGT	Este trabajo
AJ297721.1	MtENOD11-F MtENOD11-R	ATCCCAATATGCCTCCAA AGGAAGTGGTGGCTTTAGCA	(Gonzalez-Rizzo <i>et al.</i> , 2006)
Medtr2g033380.1	MtTAS3-F MtTAS3-R	TGGGTGCTATCCTATCTGAGC AAAAGGGAAAAACGGAGACG	Este trabajo
Medtr1g083460.1	MtRPL18 <i>Bam</i> HI Fwd MtRPL18 <i>Xba</i> I Rev MtRPL18 Rev Seq MtEXP7 <i>Eco</i> RI 342	CGGGATCCGGTATCGATCTTAAGGCAGGAGG GCTCTAGATCAAACCTCTGAATCCTCTGCTCTTC GTTCTCCGAACAAGGAACCGAT GCTCATTGATTTGTACTTGTACATGTGTTC	Este trabajo
DQ899790.1	Fwd MtEXP7 <i>Sac</i> I 18 Rev	CACCCTGGTCTGTGAAAGAATTGTTAATCCTC	Este trabajo
V00140.1	CaMV 35S Fwd 3`OCS Rev M13 Fwd SeqpGAT	GAGGACACGCTCGAGTATAAGAGC CATGCGATCATAGGCGTCTCG GTAAAACGACGGCCAGT GGCACGACAGGTTTCCCGAC	(Mazziotta <i>et al.</i> , 2012)
Medtr3g031300.1	pre-miR390b Fwd pre-miR390b Rev	CACCGAGTATAGGAGGGTCCGGTAAAGCTC AGTAGTAAGAAGAACC GG T G A A A	Este trabajo Este trabajo

<sup>a</sup> Gen de Medicago truncatula Mt3.5 o N° de acceso del GenBank

Identificador del miR <sup>a</sup>	Nombre del miRNA	Secuencia del miRNA	Referencia
MI0005574/MI0005615/ MI0005629	miR160b/d/e	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
MI0005594/MI0005618/ MI0005628	miR166e/g/h	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	(Boualem <i>et al.</i> , 2008)
MI0005578/MI0005631	miR169d/l	AAGCCAAGGATGACTTGCCGG	(Combier <i>et al.</i> , 2006)
MI0018372	miR171h	CGAGCCGAATCAATATCACTC	(Devers <i>et al.</i> , 2011)
MI0005600	miR172a	AGAATCCTGATGATGCTGCAG	(Jagadeeswaran <i>et al.</i> , 2009)
MI0005586	miR390a/b	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	(Jagadeeswaran <i>et al.</i> , 2009)
MI0005622	miR396b	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT	(Lelandais-Briere <i>et al.</i> , 2009)
MI0010543	miR1509a/b/c	TTAATCTAGGAAAATACGGTGG	(Zhai <i>et al.</i> , 2011)
MI0010858	miR2118	TTACCGATTCCACCCATTCCTA	(Zhai <i>et al.</i> , 2011)
Medtr2g033380.1	tasiARFs	TTCTTGACCTTGTAAGACC	(Jagadeeswaran <i>et al.</i> , 2009)

<sup>a</sup> N° de acceso de la base de datos miRBASE o identificador del gen en el genoma de *M. truncatula*