



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

“Estudio de las bases moleculares de la interacción *P. vulgaris*- *R. etli* durante las etapas tempranas de la simbiosis”

Lic. María Virginia Dalla Vía
Director: Dr. Flavio Blanco
Co director: Dr. O. Mario Aguilar



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

UNLP-CONICET- Año 2014

Agradecimientos

Al Dr. Flavio Blanco por su dirección y la formación intelectual y humana que me brindó durante mi tesis de doctorado. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. María Eugenia Zanetti por sus aportes e interés en mi proyecto de investigación y formación.

Al Dr. Mario Aguilar por la co-dirección y a los miembros del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular por brindarme un lugar de trabajo.

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

A los CPAs del Insituto; Gisela, Paula, Silvana, Bernabé, Abel y Claudio por sus aportes en el trabajo de investigación y en el trabajo diario dentro del laboratorio.

Siempre voy a estar agradecida con mis compañeros de laboratorio; Mauricio Reynoso, Carolina Rípodas, Joaquín Clúa, Virginia Savy, Karen Hobecker, Marcos Lancia, Lucia Maziotta, Candela Narduzzi, Soledad Traubenik, Ana Claudia Flores, Priscila Calderoni, Efren Ramos y Claudio Rivero, por su amistad, asistencia y consejos en los 4 años y medio de trabajo.

Finalmente quiero agradecer a Martín y mi hijo Facundo, a mis padres, mis hermanos Mercedes y Santiago y a toda la familia por todo el apoyo y fuerza que me dieron para alcanzar un gran logro.

Índice General

Índice.....	1
Abreviaturas.....	6
Introducción.....	11
Hipótesis y objetivos.....	29
Capítulo I. Resultados.....	31
Capítulo II. Resultados.....	47
Discusión Capítulos I y II.....	65
Resultados y Discusión Capítulo III.....	73
Materiales y Métodos.....	107
Bibliografía.....	132

Índice Temático

Introducción.....	11
Leguminosas.....	11
Leguminosas modelo.....	12
<i>Phaseolus vulgaris</i> , importancia como cultivo agronómico y modelo de investigación.....	13
Interacción <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i>	14
Infección y organogénesis en leguminosas.....	15
Mecanismos de señalización implicados en la interacción con rizobio.....	20
GTPasas monoméricas involucradas en procesos de crecimiento polar en raíz y en la interacción simbiótica.....	22
Dinámica de la simbiosis analizada por transcriptómica.....	26
Hipótesis y objetivos.....	29
Capítulo I. Análisis funcional de RabA2 durante las etapas tempranas de la nodulación en <i>P. vulgaris</i>	31
Generación de plantas compuestas que expresan <i>RabA2</i> ^{Q64L} y <i>RabA2</i> ^{S26N}	31
Análisis del crecimiento polar de pelos radicales en raíces <i>RabA2</i> ^{Q64L} y <i>RabA2</i> ^{S26N}	34
Evaluación del efecto de la expresión de <i>RabA2</i> ^{Q64L} y <i>RabA2</i> ^{S26N} en los eventos tempranos de la nodulación y la formación de nódulos.....	36

RabA2 participa en la preferencia de cepas de rizobios en un cultivar Mesoamericano	39
RabA2 participa en la formación del hilo de infección (IT)	40
Localización subcelular de las fusiones traduccionales GFP-RabA2 ^{WT} , GFP-RabA2 ^{Q64L} y GFP-RabA2 ^{S26N}	43
Capítulo II. Análisis de la GTPasa monomérica ARFA1 en procesos de crecimiento polar y en la nodulación en <i>M. truncatula</i>	47
Identificación de genes coexpresados con <i>RabA2</i> en <i>M. truncatula</i>	47
<i>Mdtr5g034130</i> codifica para una GTPasa monomérica de la familia ARFA1	50
Niveles de expresión de los distintos miembros de la subfamilia ARFA1 en órganos y distintas condiciones bióticas en <i>M. truncatula</i> , <i>A. thaliana</i> y <i>P. vulgaris</i>	53
Localización subcelular de ARFA1 y colocalización con RabA2	56
Generación de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i> que expresan <i>ARFA1</i> ^{WT} , <i>ARFA1</i> ^{Q71L} y <i>ARFA1</i> ^{T31N}	58
La expresión de <i>ARFA1</i> ^{Q71L} y <i>ARFA1</i> ^{T31N} en raíces de <i>M. truncatula</i> afecta eventos de crecimiento polar	60
La expresión de las formas mutantes de <i>ARFA1</i> en raíz disminuye el número de nódulos en <i>M. truncatula</i>	63
Discusión Capítulos I y II	65
RabA2 y ARFA1 están involucradas en eventos de crecimiento polar	65
RabA2 participa en la formación del IT.....	66
RabA2 participa en la especificidad de cepa en <i>P. vulgaris</i> y ARFA1 afecta la nodulación en <i>M. truncatula</i>	68
ARFA1 colocaliza con RabA2 en estructuras puntuadas en células corticales de raíz de <i>M. truncatula</i>	71
Conclusiones finales	72
Capítulo III. Análisis del transcriptoma de <i>P. vulgaris</i>: regulación transcripcional modulada por moléculas de EPS, LPS y NF de <i>R. etli</i>	73
Diseño experimental	73
Obtención de bibliotecas, secuenciación y análisis de los datos.....	75
Análisis de la expresión de nodulinas	82
Clustering de los genes diferenciales regulados por EPS, LPS y NF	82

Análisis de los factores de transcripción diferencialmente regulados por EPS, LPS y NF en <i>P. vulgaris</i> en etapas tempranas de la nodulación.....	91
Identificación de genes diferenciales implicados en la percepción y transducción de señales regulados por EPS, LPS y NF.....	97
Análisis de los genes diferenciales involucrados en la biosíntesis de hormonas, procesos de óxido reducción y en respuesta de defensa y estrés regulados por EPS, LPS y NF.....	98
Análisis de genes implicados en la remodelación de pared celular regulados por EPS, LPS y NF.....	101
Identificación de genes diferenciales involucrados en el procesamiento de sRNAs regulados por EPS, LPS y NF.....	103
Señalización por etileno, giberelina, jasmonato y ABA reguladas por las moléculas EPS, LPS y NF.	104
Conclusión General	106
Materiales y Métodos.....	107
Material biológico.....	107
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	107
Medio Fahraeus.....	107
Esterilización y germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. truncatula</i>	107
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	108
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	109
Concentración de antibióticos.....	110
Técnicas de DNA recombinante	110
Minipreparación de DNA plasmídico	110
Electroforesis de DNA	110
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	111
Generación de células de <i>E. coli</i> DH5a competentes químicas.....	112
Transformación de células de <i>E.coli</i> competentes	112
Generación de células de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 electrocompetentes	112
Generación de células de <i>A. rhizogenes</i> ARqual electrocompetentes.....	112
Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> K599 y <i>A. rhizogenes</i> ARqual electrocompentes.....	113
Mutagénesis dirigida.....	113
Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY	114

Ensayos biológicos.....	115
Generación de plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. truncatula</i>	115
Transformación de <i>P. vulgaris</i> mediante <i>A. rhizogenes</i> K599.....	115
Transformación de <i>M. truncatula</i> mediante <i>A. rhizogenes</i> Arqual	115
Métodos de cotransformación con la cepa ARqual de <i>A. rhizogenes</i> en raíces de <i>M. truncatula</i> para ensayos de colocalización	116
Inoculación de las raíces de <i>P. vulgaris</i> con <i>R. etli</i> y recolección de tejido de raíz.....	116
Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con <i>S. meliloti</i> y recolección de tejido de raíz.....	117
Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos.....	117
Extracción de RNA	117
Síntesis de cDNA	118
Ensayos de RT-qPCR	118
Análisis de la expresión del transgen y las fusiones a GFP mediante <i>Western blot</i>	119
Extracción de proteínas totales	119
Separación de proteínas por SDS-PAGE	119
Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	119
Inmunodetección y revelado por quimioluminiscencia	119
Caracterización fenotípica de las plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. truncatula</i>	120
Eficiencia de transformación cuantificada en <i>M. truncatula</i>	120
Análisis del fenotipo de pelo radical y del hilo de infección (IT).....	121
Fenotipo de raíz y raíces laterales en plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	121
Cinética de nodulación.....	121
Diámetros de nódulos	122
Ensayos de coinoculación y análisis de polimorfismo del gen <i>nodC</i>	122
Microscopía confocal y electrónica de transmisión (TEM).....	123
Bioinformática	123
Análisis informático de genes coexpresados con RabA2 en <i>M. truncatula</i>	123
Análisis filogenético de los miembros de ARFA1 en <i>P. vulgaris</i> y <i>M. truncatula</i>	124

Análisis del transcriptoma de raíces de <i>P. vulgaris</i> inoculadas con distintas cepas de <i>R. etli</i> por RNAseq.....	124
Material vegetal, diseño experimental y secuenciación masiva.....	124
Procesamiento y análisis de la información de la secuenciación.....	126
<i>Clustering</i> de los genes diferenciales en las muestras de RNAseq.....	128
Secuencias utilizadas en el trabajo de tesis.....	128
Bibliografía	132
Anexo II. tabla suplementaria 1. Lista de genes coexpresados con RabA2 en <i>M. truncatula</i> .DVD adjunto	
Anexo II.Videos suplementarios 1 y 2.....	DVD adjunto
Anexo III. Tabla suplementaria 1. Lista de los genes diferenciales y valores de FPKM.....	DVD adjunto
Anexo III. tabla suplementaria 2 . Datos de <i>clustering</i> muestras YEM/CE3/CE338	DVD adjunto
Anexo III. tabla suplementaria 3. Datos de <i>clustering</i> muestras YEM/CE3/CE109	DVD adjunto
Anexo III. tabla suplementaria 4. Datos de <i>clustering</i> muestras YEM/CE3/NF	DVD adjunto
Anexo III. tabla suplementaria 5. Datos de <i>clustering</i> muestras YEM/CE3/CE343	DVD adjunto
Anexo III.Figura suplementaria 1. Heatmaps de los clusters seleccionados	DVD adjunto
Anexo III. Figuras suplementarias 2-6. Gráficos de los valores de FPKM de los genes diferenciales de las tablas 6 a 10 del Capítulo III.....	DVD adjunto

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico

AFLPs: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AGO: argonauta

AP: *Adaptor Protein*

ARF: *ADP Ribosilation Factor*

Asn (N): Asparragina

B: Bacteroide

bHLH: factores de transcripción del tipo *basic Helix loop helix*

CA: Constitutivamente Activa

CaMV 35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor

CCaMK: *calcium calmodulin dependent kinase*

cDNA: ácido desoxirribonucleico copia

CRE: *cytokin response element*

Ct: ciclo de detección umbral de qPCR

CW: *Cell Wall*

DMI: *gen does not make infections*

DN: Dominante Negativa

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPI: días post-inoculación

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

EIN2: *Ethylene Insensitive 2*

EMS: metanosulfonato de etilo

ENODs: *Early Nodulin*

EPS: Exopolisacáridos

ERF: *Ethylene Response Factor*

ERN: *Ethylene Response Factor Required for Nodulation*

FLAG: péptido DYKDDDDK

GAI: *Giberellic Acid-Insensitive*

GAPs: *GTPases Activation Proteins*

GAPs: *Guanine Activating Proteins*

GDI: *Guanosine Disociations Inhibitors*

GDI: *Guanosine Nucleotide Dissociation Inhibitors*

GDP: guanosina di-fosfato

GEFs: *Guanine Nucleotide Exchange Factor*

GFP: *Green Fluorescence Protein*

Gln (Q): glutamina

GO: *Gene Ontology*

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

GTP: guanosina tri-fosfato

GUS: β -glucuronidasa

h: hora

HA: hectáreas

HBG: gránulos de poli- β hidroxibutirato

HD-Zip: *homeodomain-leucine zipper*

HF: *epitope dual His-FLAG*

His: epitope de histidinas

HPI: horas post-inoculación

HRP: *horseradish peroxidase*

IPD3: *interacting protein of dmi3*

IT: hilo de infección

LB: borde izquierdo del T-DNA

Leu (L): Leucina

LHK1: *Lotus Histidin Kinase 1*

LIN: *lumpy infection*

LPS: Lipopolisacáridos

LRR: *leucine rich repeat*

LYK3: *LysM receptor like kinase III*

LysM : *N-acetyl-glucosamine binding lysin motifs*

LysR: receptores con dominios LysM
mg: miligramo
miRNA: micro RNA
min: minutos
MOPS: ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfónico ácido 4-(N-Morfolino)propanosulfónico
mRNA: RNA mensajero
MVBS: *Multivesicular Bodies*
MW: marcador de peso molecular
NAP1: *Nck-Associated Protein*
NF: *Nod factor*
NFP: *nod factor perception*
NFR: *Nod Factor Receptor*
NF-Y: *nuclear factor Y*
NGS: *Next Generation Sequencing*
NIN: *nodule inception*
NUP: nucleoporina
NSP: *Nodulation Signaling Pathway*
ocs: octopina sintasa
OD₆₀₀: Densidad Óptica de una muestra medida con una longitud de onda de 600 nm.
ORF: *open reading frame*
Pb: pares de bases
PBS-T: buffer fosfato salino con Tween 20%
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PIR1: *121F-specific P53 inducible RNA*
PIT: pre hilo de infección
RAPDs: *Random Amplified Polymorphic DNA*
RB: borde derecho del T-DNA
RE: Retículo endoplasmático
RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RLK: *receptor like kinase*
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RNAseq: secuenciación masiva de RNA
RT- qPCR: Real Time - reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT: transcripción reversa

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

seg: segundos

Ser (S): Serina

siRNAs: *small interfering* RNA

SKL: *Sickle mutant*

SM: membrana del simbiosoma

SNARE: *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor*

SNPs: *Single-Nucleotide Polymorphism*

sRNAs: pequeños RNAs

TAS: transcrito no codificante del que derivan tasiRNAs

tasiRNAs: *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

TGN: Trans Golgi Network

Thr (T): treonina

TILLING: *Target Induced Lessions in Genomes*

TRAP: *Translating Ribosome Affinity Purification*

UTR: *untranslated region*

UV: luz ultravioleta

VAMP: *Vesicle Associated Membrane Proteins*

xg: veces de gravedad

ZEP: *Zeaxanthin epoxidase*

INTRODUCCIÓN

Introducción

Leguminosas

La familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, comúnmente llamadas leguminosas, incluye árboles, arbustos y plantas herbáceas que pueden identificarse por su fruto tipo legumbre, nombre con que se designan a las semillas encerradas en una vaina. Son la tercer gran familia de plantas superiores con aproximadamente 20,000 especies. Una característica sobresaliente de esta familia es que la mayoría de las *Fabaceae* establecen una relación simbiótica con bacterias del suelo denominadas rizobios. Estas bacterias poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) en formas asimilables por la planta (NO_3^- o NH_3) en órganos especializados denominados nódulos.

Algunas de las especies de leguminosas de importancia agronómica incluyen *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (poroto), *Pisum sativum* (arveja), *Cicer arietinum* (garbanzo), *Medicago sativa* (alfalfa) y *Arachis hypogaea* (maní) (figura 1). El área utilizada a nivel mundial para la siembra de leguminosas de grano y forrajeras es de aproximadamente 190 millones de hectáreas (Ha), correspondientes a un 12-15 % de la superficie de la tierra (Graham and Vance, 2003) y representan el 27 % de la producción primaria de cultivos del mundo (Vance et al., 2000). Las leguminosas son utilizadas en la rotación de cultivos y recuperación de ecosistemas debido al aporte de formas asimilables de N_2 , cumpliendo un papel importante en la agricultura sustentable a través de una reducción del uso de fertilizantes químicos (Gruber and Galloway, 2008).

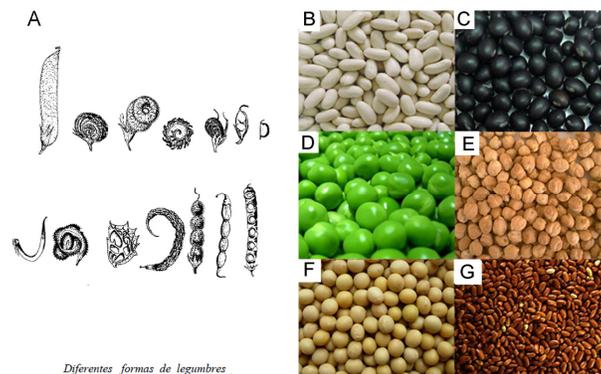


Figura 1. Distintas semillas de leguminosas. A. Diferentes tipos de legumbres .B. *P. vulgaris*, variedad Alubia. C. *P. vulgaris*, variedad Negro Xamapa. D. *P. sativum* (arveja) .E. *C. arietinum* (garbanzo) F. *G. max* (soja) F. *M. sativa* (alfalfa).

Leguminosas modelo

Las leguminosas *M. truncatula* y *Lotus japonicus* fueron seleccionadas como especies modelo por su fácil manipulación en laboratorio, ciclo de vida corto (3-4 meses), alta producción de semillas, genoma pequeño y diploide y disponibilidad de métodos de transformación genética (Cook, 1999). La especie *M. truncatula* es representativa de las leguminosas de climas templados, puede reproducirse por autofertilización o por cruzamientos y la secuencia del genoma se encuentra disponible en bases de datos (Young et al., 2011). Si bien comparten muchas características, estas especies producen diferentes tipos de nódulos; *M. truncatula*, al igual que otras leguminosas típicas de climas templados tales como alfalfa y arveja, genera nódulos indeterminados, mientras que *L. japonicus* y *P. vulgaris*, de climas cálidos, pertenecen al grupo de leguminosas que desarrolla nódulos determinados. Los nódulos indeterminados se caracterizan por un meristema persistente que continuamente genera nuevas células, mientras que los nódulos determinados no tienen un meristema persistente y todas las células del nódulo se encuentran en el mismo estadio de diferenciación. Considerando las ventajas que poseen ambas especies modelo, se han generado diversas herramientas para el estudio de las bases moleculares implicadas en el proceso de simbiosis. Las herramientas de genética directa desarrolladas para los análisis funcionales en *M. truncatula* incluyen colecciones de mutantes obtenidas por tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS) o rayos γ (Benabou et al., 1995; Sagan et al., 1995). Además, se generaron poblaciones de mutantes insercionales con transposones *Tnt-1* (D'Erfurth et al., 2003; Tadege et al., 2008; Pislariu et al., 2012) y métodos de transformación genética. Uno de los métodos de transformación permite la generación de plantas transgénicas estables mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* (Trieu and Harrison, 1996; Araújo et al., 2004). Otro de los métodos desarrollados consiste en la generación de plantas compuestas con una parte aérea salvaje y raíces transgénicas utilizando *A. rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001). Asimismo, recientemente se han creado bases de datos de expresión a partir de hibridaciones de microarreglos de *Affymetrix* y datos de secuenciación masiva de RNA (RNAseq) realizados con tejido de *M. truncatula* correspondiente a distintos órganos y distintas condiciones bióticas (Benedito et al., 2008; He et al., 2009; Boscari et al., 2013; Donà et al., 2013; Roux et al., 2014). Estas técnicas y herramientas permitieron identificar una gran diversidad de genes requeridos para la nodulación.

***Phaseolus vulgaris*, importancia como cultivo agronómico y modelo de investigación**

Se han descrito aproximadamente 50 especies del género *Phaseolus*, siendo *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*, y *P. lunatus* las especies con mayor impacto agronómico (Martínez-Romero, 2003). El poroto es utilizado en la dieta humana por el alto contenido proteico de sus frutos, que ronda entre el 20 y 25 % y es fuente de un alto contenido de vitaminas y minerales, tales como biotina, hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, y cobre. Debido a su alto valor nutricional, el grano es utilizado como complemento de las dietas ricas en hidratos de carbono, siendo África y América Latina los principales consumidores (Broughton et al., 2003). Una característica de este cultivo es su versatilidad, pudiéndose adaptar a diversas condiciones climáticas y regiones, siendo preferentes las regiones templadas o tropicales. El período vegetativo puede variar entre 70 a 200 días, permitiéndole actuar como un excelente cultivo rotativo, o como una fuente continua de semillas para alimento. En conjunto, la diversidad del sistema de producción que ofrece el poroto y sus propiedades nutritivas lo distingue de otros cultivos de grano.

P. vulgaris es una especie originaria de América y se distribuye desde México hasta el Norte de Argentina. En esta distribución geográfica se encuentran dos centros de diversificación genética (figura 2); un centro Mesoamericano (norte de México hasta Colombia) y otro Andino (Ecuador, Bolivia, Perú y noroeste Argentino) separados hace aproximadamente 500.000 años, con barreras reproductivas parciales (Broughton et al., 2003). Hace aproximadamente 7000 a 8000 años se inició la domesticación de las variedades silvestres existentes en cada centro de diversificación (Gepts, 1990; Kaplan and Lynch, 1999). Cada uno de los centros de diversificación posee características distintivas, como el tamaño y color de las semillas, morfología de la planta, diferencias en los tipos de faseolina (proteína de semilla) y alelos de microsátélites (Gepts et al., 1986; Singh et al., 1991). La historia evolutiva de la especie ha sido inferida a partir del uso de marcadores moleculares, tales como RFLPs, RAPDs, AFLPs y SSRs (Gepts, 1988; Singh et al., 1991; Velasquez and Gepts, 1994; Tohme, 1996; Gepts, 1998; Papa and Gepts, 2003; Blair et al., 2006; Diaz and Blair, 2006). Asimismo, el estudio de los polimorfismos en aislamientos de nódulos de *P. vulgaris* han permitido identificar las asociación simbiótica con *Rhizobium etli*, *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. giardinii*, *R. gallicum* y algunos rizobios simbioses de leguminosas tropicales como *R. fredii* y *R. meliloti* (Hernandez-Lucas et al., 1995). Sin embargo, *P. vulgaris* se asocia preferentemente con *R. etli* (Amarger et al., 1997; Aguilar et al., 1998). La evolución del poroto en los centros Andino y Mesoamericano constituye un modelo de interés para la

investigación de la especificidad y la co-evolución de la simbiosis (Aguilar et al., 2004). Considerando la importancia del poroto como cultivo y modelo de leguminosa de grano se ha descrito un método de transformación de *P. vulgaris* con *A. rhizogenes* que permite la generación de plantas compuestas, con una parte área salvaje y raíces transgénicas (Estrada-Navarrete et al., 2006). A partir de esta técnica se han identificado genes de la planta implicados en la asociación de esta especie con rizobios altamente eficientes (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010; Mazziotta et al., 2012; Rípodas et al., 2013).

Interacción *P. vulgaris*- *R. etli*

La evaluación de polimorfismos en el alelo *nodC* de *R. etli* permitió determinar que las cepas de *R. etli* portadoras del alelo *nodC- α* son mayoritarias en suelos de la región de domesticación Mesoamericana, mientras que en los suelos del centro Andino predominan cepas portadoras del alelo *nodC- δ* (figura 2). Además, ensayos de co-inoculación con cepas *nodC- α* y *nodC- δ* revelaron que cultivares de la región Mesoamericana son nodulados preferentemente y eficientemente por cepas *nodC- α* (Aguilar et al., 2004; Peltzer Meschini et al., 2008). Estos resultados indican que los cultivares de la región Mesoamericana han desarrollado mecanismos selectivos y de reconocimiento del microsimbionte más eficiente y competitivo, por lo que se ha sugerido que existió una co-evolución entre los simbiosites en dicho centro de diversificación genética (Aguilar et al., 2004).

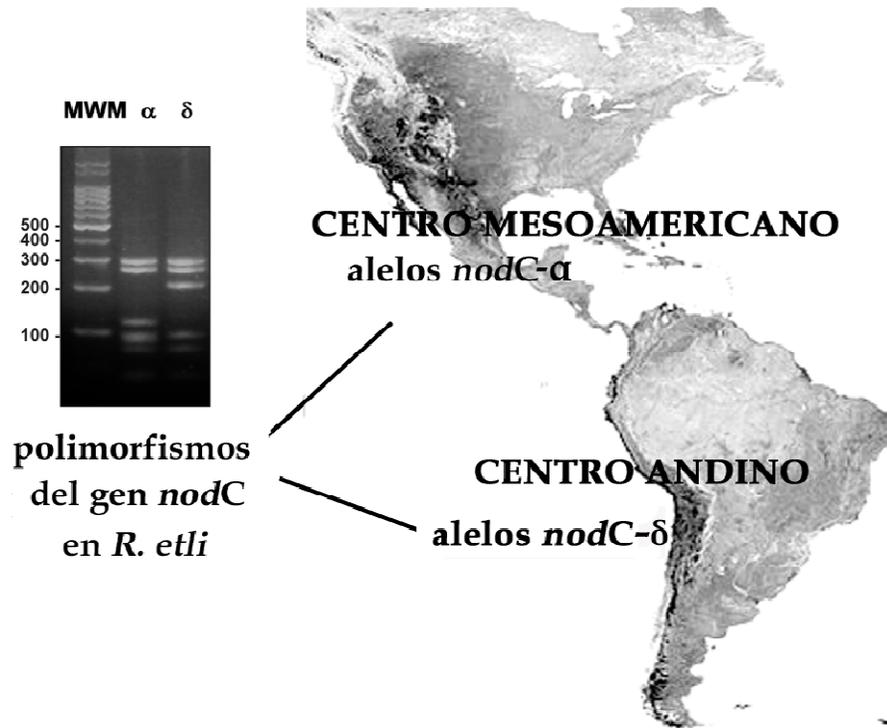


Figura 2. Esquema geográfico de los centros de diversificación genética de *P. vulgaris* y la correlación con la distribución de cepas de *R. etli* portadoras de los alelos *nodC-α* o *nodC-δ*. El polimorfismo fue analizado por PCR seguido de restricción enzimática con *HinfI* (izquierda) (Aguilar et al., 2004).

Infección y organogénesis en leguminosas

Cuando la planta se encuentra en condiciones de deficiencia de nitrógeno, las raíces exudan compuestos fenólicos (en su mayoría flavonoides e isoflavonoides) que son percibidos por el rizobio en la rizósfera (Perret et al., 2000). La percepción de estas moléculas induce cambios transcripcionales en las bacterias compatibles mediados por la activación de *nodD* (Capela et al., 2005), un factor de transcripción del tipo LysR que reconoce y se une a los promotores bacterianos de los genes *nod*, *nol* y *noe* implicados en la síntesis de moléculas lipoquitooligosacáridas denominadas factores Nod (NF). Las proteínas codificadas por los genes *nodABC* son centrales para la síntesis de esta molécula. *NodC* cataliza la síntesis del quitooligosacárido (Geremia et al., 1994), *NodB* deacetila el extremo no reductor (John et al., 1993) y *NodA* subsecuentemente cataliza la N-acilación de quitooligosacárido (Atkinson et al., 1994). El esqueleto carbonado puede presentar diversas modificaciones químicas que son específicos de cada especie y son responsables primariamente de la compatibilidad entre la planta hospedadora y especies particulares de rizobio (Dénarié and Cullimore, 1993;

Radutoiu et al., 2007). La secreción de NF en conjunto con exopolisacáridos (EPS) y la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en la pared de la bacteria participan en el intercambio de señales que resultan en el establecimiento de la simbiosis (figura 3).

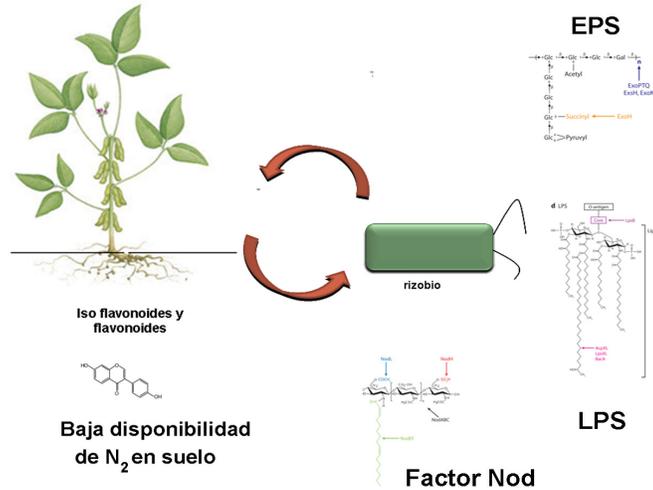


Figura 3. Intercambio de señales entre las raíces de leguminosas y rizobios. Los flavonoides e isoflavonoides exudados por la raíz actúan como señal para la síntesis del NF, que en conjunto con LPS y EPS disparan el programa de desarrollo del nódulo.

La organogénesis del nódulo y la infección son procesos coordinados e iniciados por la percepción del NF (Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd et al., 2011). La percepción de esta molécula comienza en la superficie del pelo radical, donde al mismo tiempo se produce la adhesión del rizobio mediada por lectinas de la planta (Dazzo et al., 1984; Radutoiu et al., 2003). La percepción del NF inhibe el crecimiento del pelo radical y como consecuencia se inicia un nuevo eje de crecimiento (van Batenburg et al., 1986). Este cambio genera la deformación del pelo radical alrededor de la bacteria adherida, resultando en una estructura del tipo *Shepherd's crook* (Hadri and Bisseling, 1998). Dentro de esta curvatura, el rizobio forma una microcolonia denominada foco de infección, donde se produce un aumento localizado de las concentraciones de NF que inducirían la despolarización de la membrana y cambios en los perfiles de flujo de Ca^{2+} . Estos cambios resultan en la degradación de la pared celular de la planta y el inicio de la infección (figura 4). Las enzimas de degradación o remodelación de la pared celular pueden provenir de la planta, de la bacteria o ambos simbios (Oldroyd et al., 2011).

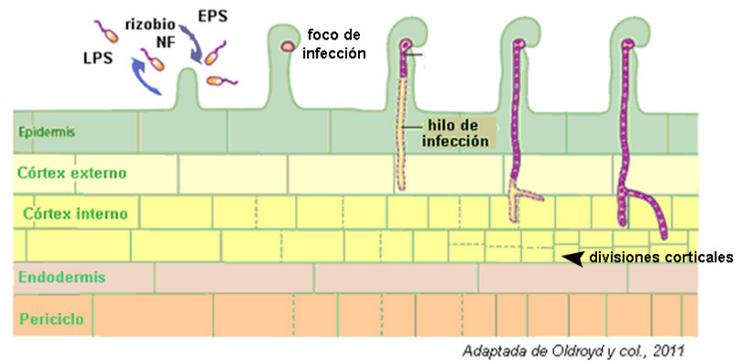


Figura 4. Etapas iniciales de la infección por rizobio. Los procesos de infección del rizobio y morfogénesis del nódulo ocurren coordinadamente y son regulados por el NF. La infección también requiere de las moléculas de EPS y LPS del rizobio. La percepción del NF induce la deformación del pelo radical, y la bacteria queda atrapada en el foco de infección. Para que la infección continúe, es necesaria una degradación localizada de la pared celular y la formación del IT. El rizobio continúa dividiéndose monoclonalmente dentro del IT y produciendo NF. En especies que desarrollan nódulos indeterminados, se ha descrito que el IT se elonga hacia las células corticales, fusionándose a estructuras preformadas que establecen la dirección de crecimiento del IT. Paralelamente, ocurren divisiones corticales (córtes interno o externo, dependiendo de la especie de leguminosa) que originan el primordio de nódulo, y en estas células se liberan los rizobios del IT (indicadas con una punta de flecha negra).

El crecimiento del IT puede concebirse como una inversión del crecimiento polar del pelo radical mediante un proceso que implica la invaginación de la pared celular en conjunto con la extensión de la membrana plasmática, generando una estructura transcelular, en la cual la bacteria se divide en forma monoclonal inmersa en una matriz de glicoproteínas (Miwa et al., 2006b; Jones et al., 2007a). El IT se extiende a través del pelo radical y requiere un dinámico rearrreglo del citoesqueleto y tráfico de vesículas que provea la materia prima para la síntesis de membrana plasmática, pared celular y proteínas de matriz. La dirección de crecimiento del IT es determinada por la migración del núcleo, conectada al extremo del IT mediante filamentos de actina y microtúbulos (figura 5) (Timmers et al., 1999; Gage, 2004; Arrighi et al., 2008; Fournier et al., 2008). Simultáneamente, las células corticales se dividen y desarrollan prehilos de infección (PIT), anticipando la dirección de crecimiento. El IT se elonga fusionándose a estos PIT y finalmente llegan al primordio del nódulo. En el caso de nódulos indeterminados, el primordio del nódulo deriva de células corticales internas que originan el meristema persistente, mientras que en nódulos determinados el primordio se origina de células corticales externas que dan lugar a un meristema transiente (Gibson et al., 2008). Las bacterias son liberadas en las células corticales rodeadas de una membrana

derivada de la planta formando estructuras denominadas simbiosomas, donde se diferencian a bacteroides (figura 6). En estas organelas ocurre la fijación del nitrógeno atmosférico catalizada por la actividad del complejo nitrogenasa en bajas concentraciones de oxígeno (van Brussel et al., 1992).

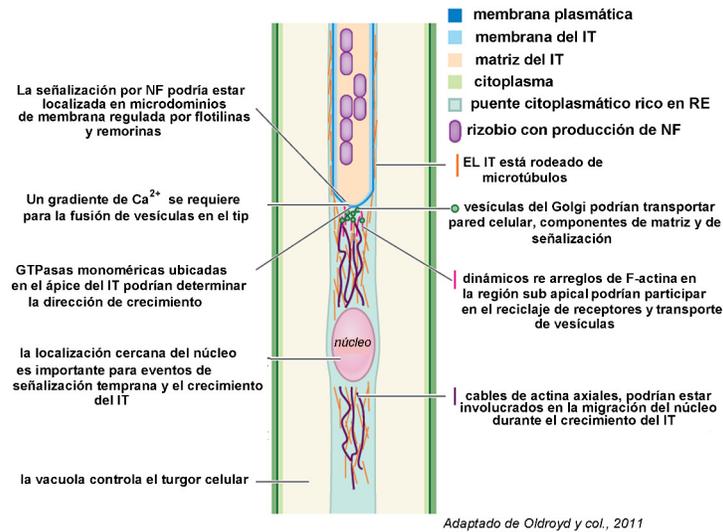


Figura 5. Modelo de crecimiento del IT durante la infección por rizobio. Durante la formación del IT, se activarían canales de Ca^{2+} , que inducirían la fusión de vesículas y la flexibilidad de la membrana plasmática en el ápice del IT. El citoesqueleto cumple un rol fundamental en el crecimiento del IT. La red de microtúbulos sería necesaria para determinar la dirección de crecimiento hacia el sitio de influjo de Ca^{2+} . El citoesqueleto de actina provee la estructura para el transporte de vesículas y la migración del núcleo. La migración del núcleo próxima al ápice del IT podría ser necesaria para eventos de señalización temprana. La estructura de F-actina y microtúbulos es requerida para la endocitosis y reciclaje de subdominios de membrana plasmática, por tanto podría regular la señalización mediada por proteínas de membrana. Las GTPasas monoméricas cumplen un rol fundamental en el crecimiento polar, regulando la dinámica de F-actina y el tráfico de vesículas.

Las respuestas fisiológicas y moleculares desencadenadas por el NF han sido reportadas en detalle (Downie, 1998; Spaink, 2000). Durante el proceso de infección, la percepción del NF ocasiona la acumulación de especies reactivas del oxígeno implicadas en la remodelación de glicoproteínas de la matriz del IT (Brewin, 2004). Asimismo, el NF induce la expresión de genes implicados en remodelación de citoesqueleto, pared celular y ciclo celular (El Yahyaoui et al., 2004; Lohar et al., 2006). Además, se ha demostrado que la producción continua del NF, en combinación con los LPS en la superficie de la bacteria, cumplirían un rol fundamental en el establecimiento de la infección y modulación de las respuestas de

defensa de la planta (Schlaman et al., 1991; Downie, 2010). Otra molécula implicada en el establecimiento de una infección efectiva en *M. truncatula* son los EPS (Gibson et al., 2008). Sin embargo, se demostró que la presencia de esta molécula no es indispensable para la infección en *P. vulgaris* (Diebold and Noel, 1989).

Recientemente se realizó un análisis de transcriptómica en raíces de soja (*G. max*) en respuesta al NF en tiempos tempranos de la infección y se identificaron nuevos genes con expresión diferencial (Hayashi et al., 2012). Ensayos de microarreglos con muestras de raíces de *L. japonicus* inoculadas con cepas mutantes de LPS (mutante *lpsβ2*) y de glucanos cíclicos (mutante *cgs*) de *Mesorhizobium loti* mostraron que los genes regulados por estas moléculas se encuentran mayoritariamente implicados en procesos de óxido-reducción y respuesta de defensa (D'Antuono et al., 2007).

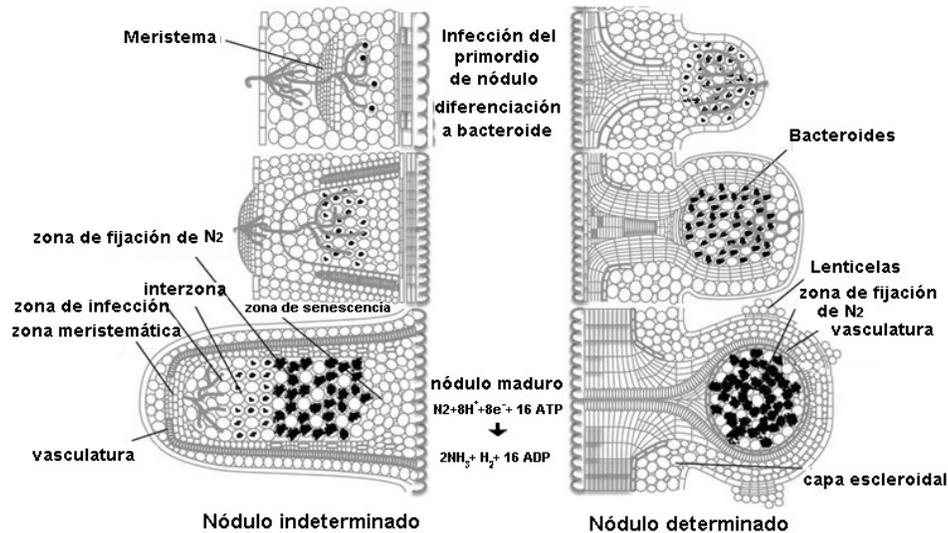


Figura 6. Organogénesis de nódulos determinados e indeterminados en la raíz. Esquema de nódulo indeterminado y determinado. Las divisiones corticales comienzan en el córtex interno en los nódulos indeterminados, o en la zona del córtex externo en nódulos determinados. En nódulos indeterminados, existe un meristema persistente que continuamente genera nuevas células. A medida que estas células maduran, son infectadas por los rizobios, generando zonas de infección, de diferenciación y de senescencia dentro del nódulo. En contraste, los nódulos determinados no tienen un meristema persistente y todas las células del nódulo se encuentran en el mismo estadio de diferenciación. Los rizobios liberados del IT se alojan en las células corticales dentro de simbiosomas, donde se diferencian a bacteroides. La reducción química del N₂ es catalizada por el complejo nitrogenasa y requiere una gran demanda energética. Ilustraciones adaptadas (Ferguson et al., 2010).

Mecanismos de señalización implicados en la interacción con rizobio

Como se mencionó anteriormente, el NF es indispensable para la infección por rizobios, y es percibido por receptores específicos. En *M. truncatula* se describieron dos receptores tipo quinasa con dominios extracelulares con motivos LysM (*N-acetyl-glucosamine binding lysin motifs*) implicados en el reconocimiento de NF denominados LYK3 (*LysM receptor like kinase III*) y NFP (*Nod factor perception*) (Limpens et al., 2003; Arrighi et al., 2006). Los genes equivalentes en *L. japonicus* se denominan *NFR1* y *NFR5* (*Nod factor receptor-1* y *Nod factor receptor-5*) (Radutoiu et al., 2003). Además se demostró que la regulación de estos receptores y su localización estaría mediada por ligasas de ubiquitina tipo E3 como LIN y PUB1, que permitirían modular la respuesta al rizobio (Kiss et al., 2009; Mbengue et al., 2010). Los dominios LysM se unirían al NF, desencadenando oscilaciones en la concentración de calcio dentro del núcleo y en la región perinuclear -denominadas *calcium spiking*- que resultan en la inducción de genes involucrados en la nodulación temprana (nodulinas tempranas, ENODs) (Ehrhardt et al., 1996; Catoira, 2000; Shaw and Long, 2003). La cascada de señalización inducida por NF también requiere de la activación de un receptor tipo quinasa con un dominio extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR), denominado *symbiosis receptor like kinase* en *L. japonicus* (*symrk*) o *does not make infection2* (*dmi2*) en *M. truncatula* (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Otros componentes requeridos para la generación de las oscilaciones de calcio son las nucleoporinas NUP y NENA (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010), y *DMII* en *M. truncatula* (Ane et al., 2004; Riely et al., 2007) y Pollux y Castor en *L. japonicus* (Charpentier et al., 2008), que codifican para canales catiónicos localizados en la membrana nuclear.

La percepción de las oscilaciones de calcio y la decodificación en el núcleo es mediada por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK) denominada DMI3 (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004). Esta quinasa interacciona y fosforila una proteína denominada CYCLOPS o IPD3 (*Interacting protein of DMI3*) (Messinese et al., 2007; Horváth et al., 2011). El complejo DMI3/IPD3 activa de manera directa/o indirecta un grupo de factores de transcripción. *NIN* (*Nodule Inception*), uno de los factores de transcripción, presenta una estructura similar a un receptor Notch con dominio RWP-RK (proteína integral de membrana con un dominio sujeto a clivaje y posterior actividad como factor de transcripción) y participa en la regulación de la infección por rizobio en epidermis y las respuestas corticales (Schauer et al., 1999). Recientemente, se ha demostrado que DMI3 fosforila a IPD3 y que el complejo

DMI3/IDP3 fosforilado se une al promotor del gen *NIN* activando su transcripción (Singh et al., 2014). También se identificaron dos factores de transcripción del tipo GRAS [familia nombrada a partir de los primeros miembros identificados, *Giberellic Acid-Insensitive* (GAI), *Repressor of GAI* (RGA) and *Scarecrow* (SCR)] nombrados como *NSP1* y *NSP2* (*Nodulation Signaling Pathway 1* y *2*, respectivamente) (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Heckmann et al., 2006). *NSP1* y *NSP2* se unen a regiones promotoras de algunos genes, tales como *ENOD11* y los factores de transcripción *NIN* y *ERN1* (Boisson-Dernier et al., 2001; Journet et al., 2001; Hirsch et al., 2009). Otros factores de transcripción activados en etapas tempranas de la nodulación necesarios para el inicio de la organogénesis son los denominados *HAP2-1/NF-YA1* y *NF-YC1* en *M. truncatula*. Además, en *P. vulgaris* se demostró que *NF-YC1* es necesario para la infección por el rizobio (Comber et al., 2006; Asamizu et al., 2008; Zanetti et al., 2010; Soyano et al., 2013). Dentro del grupo de TFs activados por NF, se demostró que *ERF1* (*ethylene response factor-1*) es esencial para la transducción de señales activada por el NF en *M. truncatula* (Middleton et al., 2007).

El reconocimiento del rizobio induce diferentes respuestas en epidermis y córtex que dan lugar a la organogénesis del nódulo, proceso que está regulado por fitohormonas. El ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico actúan como reguladores negativos de la nodulación (Oldroyd and Geurts, 2001; Oldroyd et al., 2001; Penmetsa et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Stacey et al., 2006; Sun et al., 2006). Estas fitohormonas participan en respuesta a estrés tanto biótico como abiótico, sin embargo, en la nodulación cumplirían la función de mantener un balance entre los niveles de fijación de nitrógeno y el estado fisiológico de la planta.

El etileno, es una fitohormona inducida transientemente por el rizobio durante la iniciación del nódulo (Ligero et al., 1999). Además, el etileno afecta el número de células capaces de inducir *calcium spiking* (Oldroyd et al., 2001), el crecimiento del IT (Penmetsa and Cook, 1997) y la organogénesis del nódulo (Heidstra et al., 1997; Penmetsa et al., 2003). La mutante *skl* de *M. truncatula* presentó defectos en la percepción de etileno, y se confirmó que *SKL* codifica para el gen ortólogo de *Ethylene insensitive 2* (*EIN2*) de *A. thaliana* (Penmetsa and Cook, 1997). *EIN2* es un regulador de respuesta (*Response Regulator*, *RR*) que transmite la señalización por etileno al núcleo activando la transcripción de diversos factores de transcripción. El mecanismo de acción del etileno no se encuentra completamente descrito, aunque se postula que actúa en distintas etapas de la simbiosis (Guinel and Geil, 2002). Una de las hipótesis es que esta fitohormona regula las respuestas de defensa durante la infección (Penmetsa and Cook, 1997) y se demostró que afecta el transporte de auxina durante la

nodulación (Prayitno et al., 2006). El ácido jasmónico tiene un efecto similar al etileno, decrece las oscilaciones de calcio inducidas por NF y la nodulación (Nakagawa and Kawaguchi, 2006). A diferencia del etileno, esta fitohormona regula la frecuencia del *calcium spiking* (Ehrhardt et al., 1996). La auxina también cumple una función fundamental en la organogénesis del nódulo, ya que inhibidores del transporte de auxina inducen la formación de pseudonódulos y la inducción de *ENOD40* (Fang and Hirsch, 1998; Mathesius et al., 1998).

Las citoquininas, giberelinas y brasinteroides actúan como reguladores positivos en la nodulación. En *M. truncatula*, *lhk1* (*Lotus histidin kinase 1*) codifica para un receptor de citoquininas con dominio quinasa denominado *LHK1*, y la mutante resultó incapaz de desarrollar primordios de nódulo. En éstas mutantes la formación de ITs no se encontró afectada, aunque se describieron alteraciones en la direccionalidad de crecimiento hacia el nódulo (Murray et al., 2007). En conjunto, estos antecedentes indican que diversas fitohormonas participan en la organogénesis del nódulo.

En resumen, las moléculas de señalización del rizobio cumplen un rol fundamental para una eficiente infección, siendo el NF indispensable para inducir respuestas tempranas como son la deformación del pelo radical, inducción de nodulinas y una correcta infección y organogénesis del nódulo. En particular, la organogénesis del nódulo es consecuencia del balance de fitohormonas regulado por los eventos de señalización activados por la percepción del rizobio. Por su parte, el LPS y EPS cumplirían un papel en etapas tempranas de la infección, posiblemente en la modulación de las respuestas de defensa de la planta.

GTPasas monoméricas involucradas en procesos de crecimiento polar en raíz y en la interacción simbiótica

El proceso de crecimiento del IT requiere de un crecimiento polar en dirección opuesta a la de la elongación del pelo radical. Este proceso se caracteriza por un intenso tráfico de vesículas asociado a eventos de señalización y de remodelación de membrana, donde las GTPasas monoméricas actúan como reguladores de las distintas etapas del proceso (Jones et al., 2002; Preuss et al., 2004a; Surpin and Raikhel, 2004; de Graaf et al., 2005).

Las GTPasas monoméricas en plantas constituyen la superfamilia ras, organizada en 5 subfamilias, Ras, Rab, Rho Arf y Ran (Kahn et al., 1992; Vernoud et al., 2003). Las subfamilia Ras regula la proliferación celular en levaduras y mamíferos; las GTPasas Rho controlan la reorganización de filamentos de actina y las vías de transducción de señales

asociadas con quinasas; las GTPasas Arf y Rab participan en distintas etapas del tráfico entre membranas, mientras que las GTPasas Ran regulan el transporte de proteínas y RNA a través de la membrana nuclear. A diferencia de animales y levaduras, en *A. thaliana* no se identificó la subfamilia Ras, sugiriendo la presencia de un mecanismo único de control de la señalización celular en el desarrollo en plantas (Meyerowitz, 2002).

Las GTPasas monoméricas actúan como interruptores moleculares que oscilan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. La activación es regulada por factores de intercambio de guanina (GEFs), que catalizan el intercambio de GDP a GTP, mientras que la inactivación depende de proteínas de activación de GTPasas (GAPs) que aumentan la velocidad de hidrólisis de GTP a GDP y de los inhibidores de la disociación de guanosina nucleótidos (GDIs), que previenen el intercambio GDP por GTP y mantienen a las GTPasas en un estado inactivo en el citosol (figura 7). Las GTPasas en estado activo poseen capacidad intrínseca de hidrólisis de GTP e interactúan con diversos efectores que modulan su actividad y localización.

Las GTPasas Rab poseen dominios C hipervariables, y el anclaje lipídico en la membrana está determinado por una prenilación en el C terminal. Estos dominios interactúan con componentes de cubierta de vesícula, los efectores, proteínas motoras y SNAREs (derivado de *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*, involucradas en la fusión de vesículas) y determinan la especificidad de la membrana diana, regulando el proceso de gemación de vesículas a partir de una membrana donante, el transporte de vesículas, el reconocimiento de la vesícula con la membrana aceptora y, finalmente, la fusión (Grosshans et al., 2006; Bento et al., 2013). En contraste, las GTPasas ARF presentan una miristilación en el N terminal y esta modificación lipídica es importante para el reconocimiento de las membranas donoras. La función de las GTPasas del tipo ARF es esencial en el ensamblaje de proteínas de cubierta y por tanto en la gemación de vesículas. Existen tres tipos de cubiertas de vesículas caracterizadas hasta el momento, COP I, COP II y clatrina. COP I y COP II están implicados en procesos de transporte retrogrado y anterógrado, respectivamente, entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. Las vesículas recubiertas de clatrina median el transporte entre la red de trans Golgi (TGN) y la membrana plasmática.

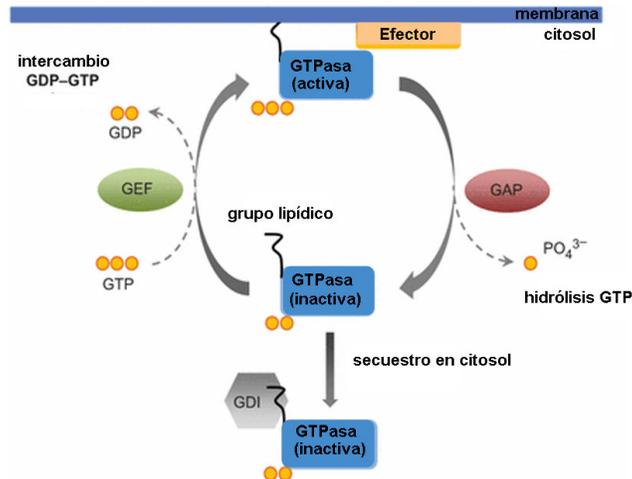


Figura 7. Ciclo de activación e inactivación de las GTPasas monoméricas. La activación e inactivación cíclica es regulada por factores de intercambio de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio de GDP a GTP, proteínas GAPs que aumentan la velocidad de hidrólisis de GTP a GDP, e inhibidores de la disociación de guanosina nucleótidos (GDIs) que previenen el intercambio GDP por GTP y mantienen a las GTPasas en un estado inactivo en el citosol. Las GTPasas en su estado activo interactúan con diversos efectores que modulan su actividad y localización. Figura adaptada de (Bento et al., 2013).

En el contexto del estudio del tráfico de membranas mediado por GTPasas monoméricas en procesos de desarrollo en plantas, se identificó en *A. thaliana* un miembro de la familia ARFA1 (factores de ribosilación de ADP) involucrado en procesos de crecimiento polar y en la formación del pelo radical (Xu and Scheres, 2005). Sin embargo, hasta el momento no se describieron GTPasas del tipo ARF implicadas en la nodulación.

Trabajos previos permitieron determinar que algunos miembros de la subfamilia Rab participan en procesos de crecimiento polar en plantas. El silenciamiento de Rab11 en tomate produjo defectos en la secreción de enzimas que degradan la pared celular, alteraciones en el crecimiento y en la dominancia apical (Lu et al., 2001). Por otro lado, Rab11 de *N. benthamiana* fue implicado en el crecimiento del tubo polínico y se localiza en la región apical del tubo polínico, en una región rica en vesículas de transporte. La sobreexpresión de las formas dominante negativa (DN) o constitutivamente activa (CA) de esta proteína llevaron a la reducción del crecimiento del tubo y a la disminución de la fertilidad masculina. Además, se demostró que la localización apical y la organización polarizada de los microfilamentos desaparecen en las mutantes DN y CA. Las mutaciones de la proteína generaron alteraciones en la exocitosis de vesículas, comprometiendo la secreción de proteínas de la pared hacia la matriz extracelular. Estos resultados sugieren que la regulación

correcta de Rab11 es requerida para el tráfico de membrana y el crecimiento polar del tubo polínico (de Graaf et al., 2005). Otras evidencias de la conexión entre las proteínas Rab y el crecimiento polar provienen de la caracterización de un miembro de la subclase RABA4 de *Arabidopsis*, RABA4b, que se localiza en el trans-Golgi *network* (TGN) en el ápice de los pelos radicales (Preuss et al., 2004a). A pesar de que mutaciones en este gen no resultaron en un fenotipo anormal de los pelos radicales, RABA4b ha sido involucrado en el crecimiento polar del pelo a través de su interacción física con la fosfatidilinositol-4-kinasa, la cual es indispensable para la morfogénesis del pelo radical (Preuss et al., 2006).

En el transcurso de los últimos años se evidenció la relación entre GTPasas y el proceso de infección por rizobio. En *M. truncatula* se demostró que los simbiosomas adquieren el marcador endocítico Rab7 y que esta GTPasa estaría involucrada en la maduración del simbiosoma (Limpens et al., 2009). Otra evidencia de la función de GTPasas en el proceso de infección constituye el miembro de la subfamilia ROP de *L. japonicus* denominado ROP6 (análogo a la subfamilia Rho en animales (Yang, 2002) que interacciona con NFR5 y participa en la formación del IT. Mientras que en *M. truncatula* se demostró que MtROP9 está involucrada en eventos tempranos de la infección (Ke et al., 2012; Kiiirika et al., 2012).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se estudió la relación entre Rab GTPasas y nodulación a partir de un gen candidato obtenido por hibridación substractiva. La identificación de genes regulados diferencialmente en la interacción poroto y *R. etli* se realizó a partir de mRNA extraído de pelos radicales del cultivar Mesoamericano inoculado con la cepa SC15 portadora del alelo *nodC- α* (*tester*) y mRNA del mismo cultivar pero inoculado con la cepa 55N1 portadora del alelo *nodC- δ* (*driver*). Se obtuvieron 41 clones con expresión diferencial, entre los que se encontró una GTPasa monomérica de la familia Rab, cuya expresión aumentó en respuesta a las cepas del tipo *nodC- α* (Peltzer Meschini et al., 2008). Esta GTPasa monomérica presentó alta homología a proteínas Rab11 de otras especies. Considerando la nomenclatura sugerida para plantas (Pereira-Leal and Seabra, 2001) el gen se nombró como RabA2 (Blanco et al., 2009). La función biológica de RabA2 en eventos de crecimiento polar en raíz y en la nodulación fue estudiada por silenciamiento. La caracterización fenotípica demostró que mientras la adhesión de las bacterias al pelo radical no está afectada, las plantas RabA2 RNAi no presentaron deformación del pelo radical ni formación de ITs. Además, luego de la inoculación, el silenciamiento por RNAi interfirió con la inducción de genes tempranos de la nodulación (*NF-YC1*, *Rip*, *ERN*, *ENOD40*). Como consecuencia, no se formaron nódulos, irrespectivamente de la cepa de *R. etli* utilizada. En conjunto estos resultados indicaron que esta proteína es requerida para el crecimiento polar

del pelo radical y en los eventos tempranos de la infección luego de la percepción del rizobio, como la deformación del pelo radical y la inducción de nodulinas (Blanco et al., 2009).

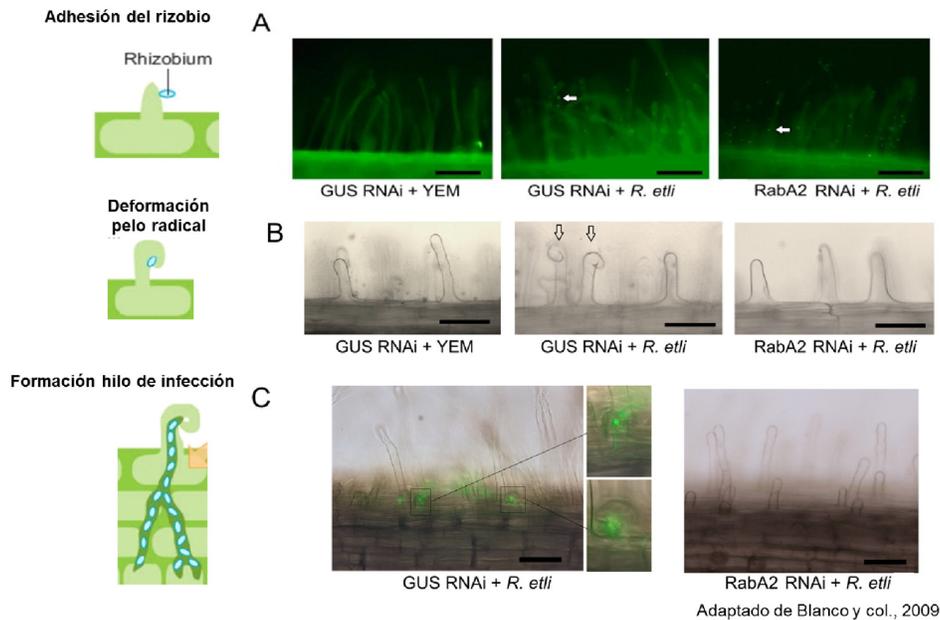


Figura 8. Efectos del silenciamiento de *RabA2* en etapas tempranas de la simbiosis. (A). No se observaron diferencias en la adhesión del rizobio entre plantas control (GUS RNAi) o *RabA2* RNAi. Las plantas expresan GFP a partir del gen presente en el vector usado para introducir el RNAi. La cepa de *R. etli* también expresa GFP en forma constitutiva. Las flechas indican las microcolonias formadas en el pelo. YEM corresponde al control sin inocular. Los pelos radicales de plantas *RabA2* no presentaron las típicas deformaciones en respuestas al rizobio (señalado con flechas en el control) (B) ni la formación de ITs (C). A la izquierda se esquematizan las etapas de la infección.

Dinámica de la simbiosis analizada por transcriptómica

El transcriptoma de una célula es el conjunto de moléculas de RNA en una determinada situación, incluyendo el mRNA, rRNA, tRNA y RNA no codificante. Se han reportado diversos estudios de transcriptómica en especies de leguminosas en respuesta a su microsimbionte a partir de ensayos de micro y macroarreglos de DNA. Estas tecnologías permiten cuantificar miles de transcritos, aunque sólo de los alelos conocidos. El desarrollo reciente de técnicas de secuenciación masiva, denominadas de nueva generación (NGS), permitió incrementar la cobertura del genoma y la cantidad de muestras analizadas. Estas nuevas tecnologías presentan diversas ventajas respecto de las técnicas de micro y macroarreglos de DNA, como son la detección de regiones transcritas no caracterizadas

previamente, nuevas variantes de *splicing* y mutaciones puntuales (SNPs). Además esta técnica permite identificar y cuantificar pequeños RNA, como los miRNA y siRNA. El análisis de transcriptómica realizado por microarreglos y secuenciación masiva (*deep sequencing*) permitió la identificación de genes diferencialmente expresados en leguminosas modelo en respuesta al rizobio en distintos estadios de la infección. La evolución de las metodologías para estudiar el transcriptoma derivó en un aumento de la complejidad de la caracterización de la respuesta molecular de la planta durante la interacción con rizobios. A partir de las técnicas basadas en la hibridación se identificaron 46 genes de *M. truncatula* diferencialmente regulados 24 (horas post inoculación) (HPI) con el microsimbionte *Sinorhizobium meliloti* (Mitra and Long, 2004). En otro trabajo realizado con macroarreglos de ADN de *M. truncatula* se identificaron más de 750 genes expresados diferencialmente luego de la infección con el microsimbionte *S. meliloti* a los 3 y 10 días post-inoculación (DPI) (El Yahyaoui et al., 2004). Posteriormente, se reportó un análisis de transcriptómica por microarreglos de ADN de *M. truncatula* con muestras obtenidas a distintos tiempos post inoculación con *S. meliloti* que permitió agrupar los genes en función de los perfiles de expresión y se identificaron distintos estadios en la infección. En los estadios tempranos I (1 HPI) y II (6 y 12 HPI) se encontraron inducidos genes involucrados en el transporte de calcio, el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, respuesta de defensa, remodelación de citoesqueleto y pared celular. En los estadios III (24-48 HPI) y IV (72 HPI) se describió una acumulación de genes implicados en la proliferación celular y la represión de algunos genes de defensa (Lohar et al., 2006). Otros genes diferencialmente regulados estarían involucrados en la percepción y transducción de señales y en la regulación transcripcional en todos los estadios. En otro estudio de transcriptómica se utilizaron colecciones de mutantes de *M. truncatula* y *S. meliloti* con el fin de detectar el transcriptoma específico de nódulos. En este ensayo se describen dos patrones transcripcionales significativos. Uno de ellos corresponde a la represión de genes de respuesta de defensa y la inducción transitoria de genes del ciclo celular y síntesis de proteína en etapas tempranas de la organogénesis del nódulo. Por otro lado, se detectó la activación de vías secretorias en conjunto con la activación transcripcional de proteínas transmembrana y proteínas de secreción o péptidos durante la organogénesis (Maunoury et al., 2010). En concordancia con este trabajo, el grupo de Pascal Gamas reportó el estudio del transcriptoma de *M. truncatula* y mutantes de *S. meliloti* por microarreglos y detectaron patrones de activación de transcripción en nódulos y posibles genes reguladores. Los patrones de expresión fueron clasificados en cuatro etapas relacionadas con eventos tempranos de señalización y posterior organogénesis del nódulo. En particular, se detectaron

como diferenciales genes involucrados en la vía de biosíntesis de citoquininas en etapas tempranas del desarrollo del nódulo (Moreau et al., 2011). En *L. japonicus* se describió la expresión global en distintos órganos, estadios de desarrollo del nódulo y en respuesta a la inoculación con *Mesorhizobium loti*. Este análisis permitió identificar un alto número de genes regulados diferencialmente en las etapas de infección y organogénesis del nódulo, entre ellos reguladores transcripcionales, receptores y proteínas de transducción de señales (Høgslund et al., 2009).

Los estudios del transcriptoma han sido revolucionados por el desarrollo de NGS. Estas nuevas tecnologías fueron utilizadas para el estudio de transcriptoma en la simbiosis y recientemente se han publicado algunos trabajos. En *G. max*, se reportó el transcriptoma de pelos radicales inoculados con *Bradyrhizobium japonicum* (denominada actualmente como *Bradyrhizobium diazoefficiens*) y se identificaron aproximadamente 2000 genes con expresión diferencial respecto de pelos radicales no inoculados. Entre los genes inducidos se detectaron el receptor del NF *Nfr5* y el regulador transcripcional *nin* (Libault et al., 2010). A partir de otro análisis de transcriptómica realizado por RNAseq en *M. truncatula* detectó nuevos transcritos y además se describió la dinámica transcripcional asociada a la organogénesis del nódulo y estadios posteriores del nódulo (Boscari et al., 2013). Por otro lado, el análisis integrado de la expresión génica de *M. truncatula* y su microsimbionte por microdissección láser de nódulos y posterior análisis por RNAseq permitió identificar TFs candidatos y además se generó una nueva base de datos disponible en la web (Roux et al., 2014). En conjunto, los análisis de transcriptómica permitieron identificar nuevos candidatos que participan en el proceso de simbiosis, relacionados con la percepción y respuesta de señalización, respuesta de defensa, factores de transcripción y estrés oxidativo, entre otros.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo y objetivos

La interacción simbiótica *P. vulgaris*- *R. etli* constituye un excelente modelo para el estudio de los determinantes moleculares que participan en la selectividad de cepas más eficientes que coevolucionaron en un mismo centro de diversificación genética. Como se mencionó previamente, la GTPasa RabA2 es inducida en respuesta a la interacción con la cepa SC15 de *R. etli* y es requerida para la inducción de *NF-YC1* en respuesta a cepas del mismo centro de diversificación, sugiriendo su posible participación en el reconocimiento de cepas más eficientes (Peltzer Meschini et al., 2008). Los resultados obtenidos a partir de la sobreexpresión de RabA2 no mostraron efectos fenotípicos asociados a esta preferencia, posiblemente debido a los mecanismos de regulación postraduccionales que regulan la actividad de las GTPasas monoméricas. Por otro lado, el silenciamiento postranscripcional de RabA2 mostró que esta GTPasa participaría en el crecimiento polar del pelo radical y en eventos tempranos de la infección, pero la inhibición temprana de los eventos asociados a la nodulación no permitió evaluar el posible rol sobre la formación del IT (Blanco et al., 2009). En base a estos antecedentes, se propuso estudiar la función de RabA2 en la especificidad de cepas de *R. etli* y en el proceso de formación del IT. Teniendo en cuenta la importancia de las GTPasas en la nodulación, se propuso identificar otros componentes que pudieran ampliar el análisis de la función de las GTPasas monoméricas en la nodulación en especies modelo como *M. truncatula*.

Los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de infección y organogénesis han sido estudiados exhaustivamente por medio de análisis de genética funcional de mutantes en las especies modelo *M. truncatula* y *L. japonicus*. En particular, se ha focalizado la investigación en la identificación de los procesos regulados por factor Nod (NF). Las moléculas de exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) del rizobio han sido asignadas como moduladoras de las respuestas de defensa de la planta. Sin embargo, hasta el momento se desconocen cuáles son los mecanismos regulados asociados a las respuestas de defensa. Otra interrogante es si estas moléculas participan en la regulación de genes involucrados en otros procesos biológicos implicados en la simbiosis. Por esta razón se propuso identificar genes regulados en las etapas tempranas de la infección por las moléculas de EPS, LPS y NF mediante el análisis del transcriptoma de *P. vulgaris* por RNAseq en respuesta a la interacción con una cepa salvaje o cepas mutantes de *R. etli*.

Para analizar las hipótesis mencionadas, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Estudiar el rol de RabA2 en la formación y crecimiento del IT y establecer su posible función en la respuesta específica a cepas de *R. etli* portadoras del alelo *nodC- α* .
2. Identificar nuevos componentes del tráfico de vesículas asociados a la nodulación y eventos de crecimiento polar en *M. truncatula*.
3. Investigar el rol de las moléculas de señalización EPS, LPS y NF del rizobio en la regulación de genes implicados en las etapas tempranas de infección de *P. vulgaris*.

CAPÍTULO I

Análisis funcional de RabA2 durante las etapas tempranas de la nodulación en *P. vulgaris*

Capítulo I. Análisis funcional de RabA2 durante las etapas tempranas de la nodulación en *P. vulgaris*

Generación de plantas compuestas que expresan *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N}

Como se mencionó en la introducción, el silenciamiento de *RabA2* por RNAi en raíces de poroto produjo la inhibición de las respuestas moleculares tempranas que ocurren en el pelo radical luego de la percepción del rizobio, y como consecuencia, la inhibición de la nodulación (Blanco et al., 2009). Sin embargo, la sobreexpresión del gen no resultó en un fenotipo observable. El clon de cDNA de *RabA2* fue aislado a partir de una biblioteca sustractiva de cDNA de interacciones simbióticas con diferente afinidad, por lo que se propuso estudiar la función de *RabA2* en la preferencia de cepa observada entre cultivares mesoamericanos y rizobios de la misma región geográfica y profundizar el análisis funcional en las etapas tempranas de la interacción *P. vulgaris*- *R. etli*. Considerando que las GTPasas monoméricas son reguladas a nivel post traduccional mediante la unión e hidrólisis de GTP, se generaron dos formas mutantes de RabA2; una incapaz de hidrolizar GTP y otra afectada en la capacidad de intercambiar GDP por GTP. Estas mutaciones se realizaron a partir del marco abierto de lectura de *RabA2* de *P. vulgaris* clonado en el vector pTOPO TA utilizando el kit de mutagénesis dirigida *Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis* (Invitrogen). Se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (tabla 14, Materiales y Métodos) para generar la sustitución de Gln en la posición 64 por una Leu (forma unida a GTP, RabA2^{Q64L}) o de la Ser 26 por Asn (forma unida a GDP, RabA^{S26N}) en el sitio catalítico de la proteína RabA2. Las secuencias de *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} fueron subclonadas en el plásmido de entrada pENTRY (Invitrogen). Posteriormente se recombinaron con el vector de destino 35S:HF-GATA (Zanetti et al., 2005), el cual permite la fusión con los epítopes FLAG y HIS (6 histidinas, 6xHis) en el extremo amino terminal (figura 9).

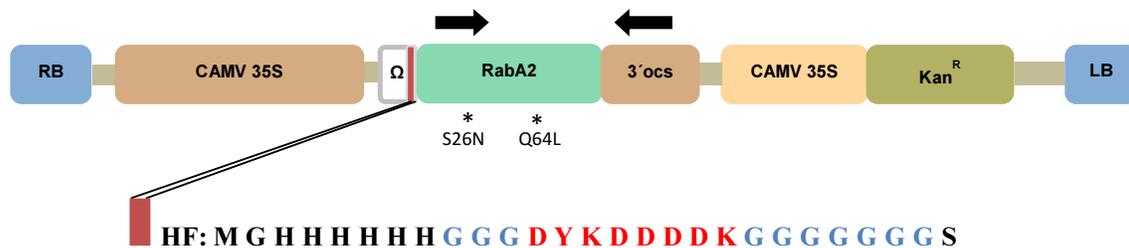


Figura 9. Esquema de las construcciones generadas para la expresión de *RabA2* y sus versiones mutantes en el vector p35S:HF-GATA. Los asteriscos indican la ubicación aproximada de las sustituciones de base generadas por mutagénesis dirigida en la secuencia de *RabA2*. EL vector p35S:HF-GATA contiene el borde derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA, el transgen bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CAMV 35S), la fusión en el N terminal a los epitopes FLAG y HISx6 (color bordó) y las regiones no traducidas 5' Ω (omega leader) y 3' *ocs* del gen octopina sintasa. Se detalla la secuencia del epítipo FLAG (en rojo), los residuos de histidinas del epítipo HISx6 (en negro) y una secuencia de 7 glicinas (en celeste) que se adicionó como brazo flexible entre los epitopes Hisx6-FLAG y la proteína RabA2. La expresión del gen *nptII* confiere resistencia a kanamicina (Kan^R). Las flechas indican las regiones de los oligonucleótidos usados para identificar el transgen mediante PCR.

Las construcciones p35S:HF-RabA2^{Q64L} y p35S:HF-RabA2^{S26N} fueron analizadas mediante PCR y confirmadas por secuenciación. Como controles se utilizaron los plásmidos p35S:GFPGUS+ y 35S:HF-GATA. Considerando que la presencia de los epitopes FLAG y HIS no tuvieron un efecto sobre el fenotipo y los resultados fueron semejantes a los obtenidos en las raíces que sobreexpresan GFP y GUS (Zanetti et al., 2010), se usó p35S:GFPGUS+ como control en la mayoría de los experimentos. Las diferentes construcciones fueron introducidas en la cepa de *Agrobacterium rizhogenes* K599 por electroporación y las cepas obtenidas utilizadas posteriormente para generar plantas compuestas (figura 10) de *P. vulgaris* mediante la técnica previamente puesta a punto en el laboratorio (Blanco et al., 2009). Las plantas compuestas, que consisten en raíces transgénicas y una parte aérea no transformada, fueron denominadas RabA2^{Q64L}, RabA2^{S26N} y GFP GUS.

La expresión de los genes se analizó por RT-qPCR en tejido de raíz de plantas RabA2^{Q64L}, RabA2^{S26N} y GFP GUS con oligonucleótidos específicos de *RabA2* o con oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de *RabA2* de poroto (RabA2 Fw) y la secuencia correspondiente a la región 3' no traducida del gen de la octopina sintasa (3' *ocs*) (tabla 14, Materiales y Métodos). En las plantas compuestas transformadas con las construcciones que contienen versiones mutadas de *RabA2* se detectó la expresión de las proteínas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} (figura 11 A). Además, se demostró que la expresión de las formas mutantes de RabA2 no afectó los niveles de mRNA correspondientes a la *RabA2* endógena (figura 11 B).

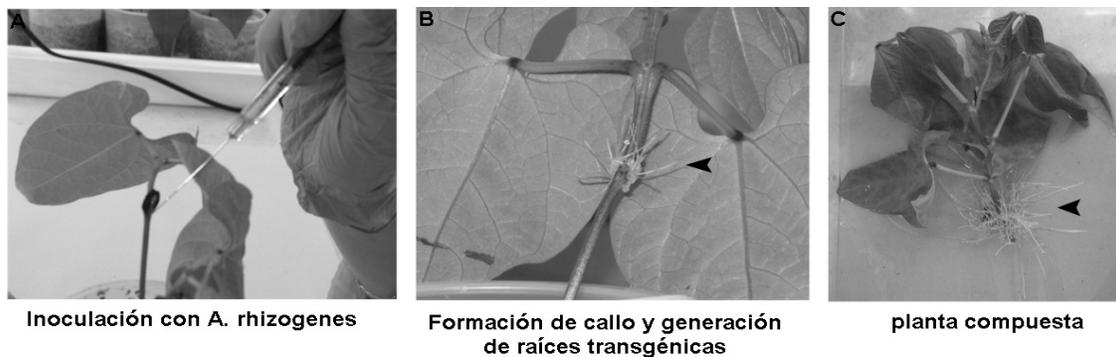


Figura 10. Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris*. A. El método consiste en la inoculación con la cepa K599 de *A. rhizogenes* conteniendo el plásmido de interés. Se produce una herida y se inyecta la bacteria en la base del cotiledón usando una jeringa con aguja. B. Imagen del callo formado en la zona de inoculación y desarrollo de las raíces transgénicas. C. Planta compuesta de *P. vulgaris* en la que se eliminó la raíz silvestre (*wild type*). Las puntas de flecha en B y C señalan las raíces transgénicas.

Para verificar que el aumento de los niveles estacionarios de mRNA fuese acompañado por un aumento de la proteína, se analizó la presencia de las proteínas RabA2 mutantes mediante un ensayo de *Western blot* a partir de tejido de raíces de plantas compuestas utilizando anticuerpos dirigidos contra el epítipo FLAG (anti-FLAG). Este análisis permitió detectar un polipéptido de aproximadamente 38 kDa correspondiente a la fusión His6-FLAG-RabA2^{Q64L} o His6-FLAG-RabA2^{S26N} en las muestras evaluadas (figura 11 C). Estos resultados indicaron que las formas mutantes de RabA2 se acumulan en las raíces de las plantas compuestas.

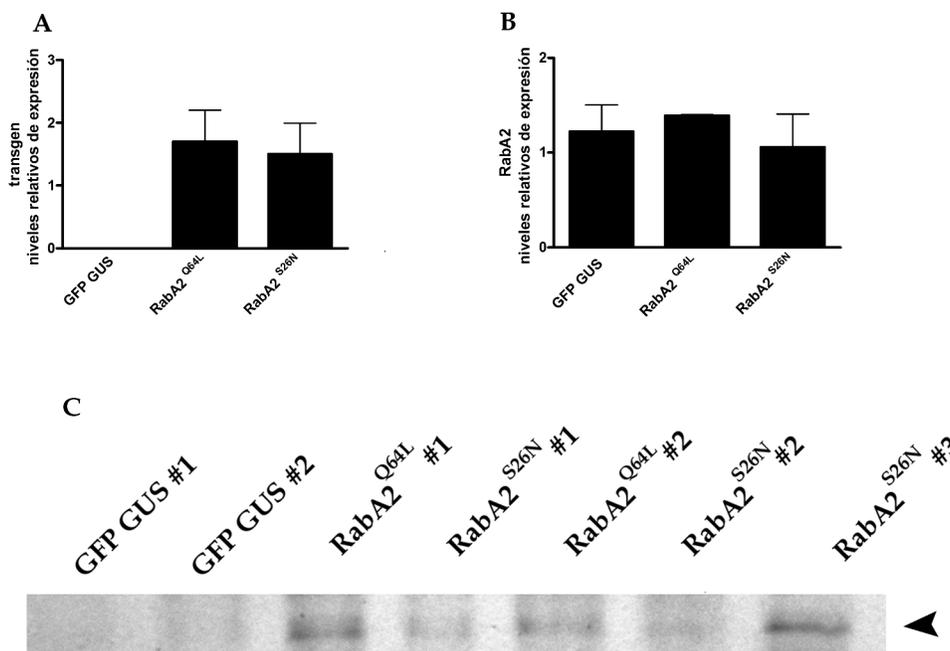


Figura 11. Análisis de expresión de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}. Niveles de expresión de las formas mutantes de *RabA2* (A) y niveles de expresión endógenos de *RabA2* (B) analizado por RT-qPCR. Las muestras de cDNA se obtuvieron a partir de tejido de 10 raíces transgénicas independientes de plantas compuestas GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} colectadas a los nueve días luego de la transferencia de las mismas a medio agar-Fahraeus. Los niveles de mRNA fueron normalizados con los valores obtenidos para el gen de referencia *EF1a*. En (A) las barras representan la media y el error estándar de la media (SEM) de las réplicas técnicas. No se detectaron diferencias significativas en los niveles endógenos de *RabA2* entre el control GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} de acuerdo al análisis estadístico del *t-test* de Student con $p < 0.05$. C. Análisis de *western blot* a partir de extractos proteicos de raíces transgénicas independientes de plantas compuestas GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} revelado con el anticuerpo anti-FLAG.

Análisis del crecimiento polar de pelos radicales en raíces RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}

Existen múltiples evidencias de la relación entre las GTPasas Rab y los procesos de crecimiento polar, como son la formación del tubo polínico y el crecimiento del pelo radical (Preuss et al., 2004b; de Graaf et al., 2005). Previamente se describió que el silenciamiento de *RabA2* afecta el número y longitud de los pelos radicales en plantas de *P. vulgaris*, sugiriendo que esta GTPasa participa en el tráfico de vesículas asociado al crecimiento polar (Blanco et al., 2009). Con el fin de examinar el fenotipo de la expresión de las formas mutantes en las raíces de poroto, se midieron la longitud y densidad de los pelos radicales (figura 12). En estos ensayos se observó que las raíces de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} presentaron una reducción en la longitud de los pelos radicales del 27 % y 23 %, respectivamente, en comparación con las raíces control GFP GUS (figura 12 A). Respecto de la densidad de pelos

radicales, medida como número de pelos por milímetro de raíz lateral, se observó que las raíces de RabA2^{S26N} presentaron una reducción del 29 %, mientras que no se observaron cambios significativos en las raíces de RabA2^{Q64L} (figura 12 B).

La deformación del pelo radical luego de la adhesión de la bacteria a la superficie del mismo es una de las respuestas tempranas de la simbiosis. Este proceso se produce por un redireccionamiento del crecimiento polar, generando una curvatura de la punta del pelo que rodea la microcolonia de la bacteria. Con el objetivo de examinar el efecto de la expresión de las versiones mutadas de *RabA2* sobre este proceso, se midió la deformación del pelo radical en raíces laterales de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} 48 h post- inoculación (HPI) con *R. etli*. Los resultados mostraron una reducción significativa del 30 % y 38 % para las formas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}, respectivamente (figura 12 C) en comparación con el control. En conjunto, estos resultados confirman la participación de RabA2 en procesos de crecimiento polar en el pelo radical. Sin embargo, el fenotipo observado en plantas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} fue menos drástico que el fenotipo observado en plantas compuestas *RabA2* RNAi.

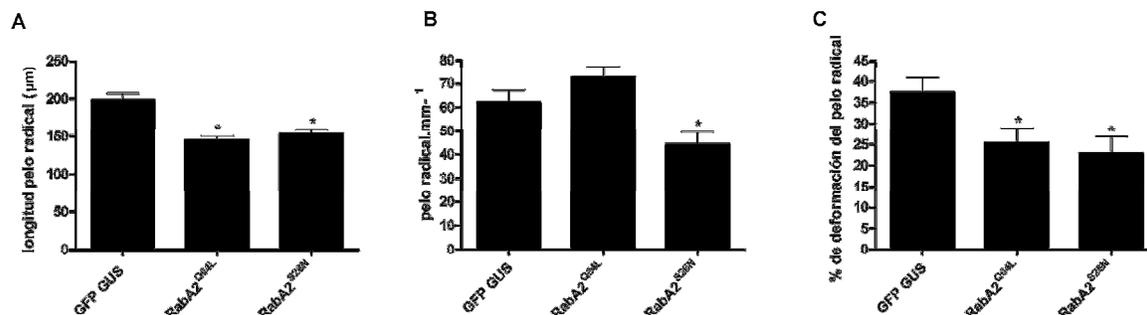


Figura 12. Efecto de las mutaciones de RabA2 sobre el crecimiento polar de pelos radicales **A.** Longitud de pelos radicales cuantificada en µm. **B.** Densidad de pelos radicales medida como número de pelos por milímetro de raíz lateral. **C.** Deformación del pelo radical medida a las 48 HPI con *R. etli*. Las mediciones se hicieron en al menos 10 raíces transgénicas independientes provenientes de 8 plantas compuestas de GFP GUS, RabA2^{Q64L} o RabA2^{S26N}. Las barras representan la media y SEM de dos replicas biológicas. Los asteriscos indican valores significativos de acuerdo al *t-test* de Student con $p < 0.05$. Para estimar la longitud, densidad, y porcentaje de deformación se cuantificaron al menos 200 pelos radicales por cada condición.

Evaluación del efecto de la expresión de *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} en los eventos tempranos de la nodulación y la formación de nódulos

Como se mencionó previamente, los niveles de mRNA de *RabA2* aumentan en la interacción más eficiente entre una variedad de *P. vulgaris* del centro de domesticación Mesoamericano y cepas de *R. etli* (alelo *nodC-α*) predominantes en suelos de esa región (Peltzer Meschini et al., 2008). *RabA2* participa en eventos tempranos de la nodulación y es necesario para la inducción por rizobio de *NF-YC1*, un factor de transcripción involucrado en la preferencia de cepa en esta interacción biológica (Zanetti et al., 2010). Para analizar si esta GTPasa monomérica podría estar relacionada con el reconocimiento específico de cepa, se realizaron cinéticas de nodulación en plantas compuestas que expresan las formas mutantes *RabA2*^{Q64L}, *RabA2*^{S26N} y el control GFP GUS, utilizando para ello las cepas de *R. etli* SC15 (alelo *nodC-α*, cepa más eficiente) y 55N1 (alelo *nodC-δ*, cepa menos eficiente) (figura 13). A los cinco días post inoculación (DPI) no se observaron diferencias en el número de nódulos entre las plantas compuestas inoculadas con las cepas SC15 y 55N1 en los 3 tipos de plantas analizadas. Sin embargo, a los 10, 15 y 20 DPI, las raíces de las plantas compuestas *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} inoculadas con la cepa SC15 presentaron una reducción del número de nódulos de 70 % y 50 % respecto del control GFP GUS, respectivamente (figura 13 A). En contraposición, las plantas GFP GUS, *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} inoculadas con la cepa 55N1 no registraron cambios significativos en el número de nódulos (figura 13 B). Estos resultados sugieren que la expresión de las formas mutantes de *RabA2* afecta la interacción con la cepa más eficiente SC15 y que esta GTPasa monomérica podría estar implicada en la preferencia de la planta por aquellas cepas más eficientes, tal como se ha descrito previamente para *NF-YC1* (Zanetti et al., 2010).

Los nódulos desarrollados en plantas compuestas *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} a los 18 DPI con la cepa de *R. etli* SC15 presentaron un menor diámetro respecto de los nódulos control GFP GUS (figura 13 C). Estos nódulos de menor tamaño eran de color pálido y carecían de lenticelas, que son pequeños poros requeridos para el intercambio gaseoso del nódulo (figuras 13 E y F, respectivamente). En contraste, los nódulos del control GFP GUS desarrollaron lenticelas y presentaron el color rosado característico de la acumulación de leghemoglobina, requerida para la fijación biológica de N₂ (figura 13 D). Los nódulos formados con la cepa menos eficiente 55N1 fueron más pequeños que los formados con SC15, y no se observaron diferencias significativas en el diámetro de los nódulos desarrollados en las plantas compuestas GFP GUS, *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} (figura 13 C).

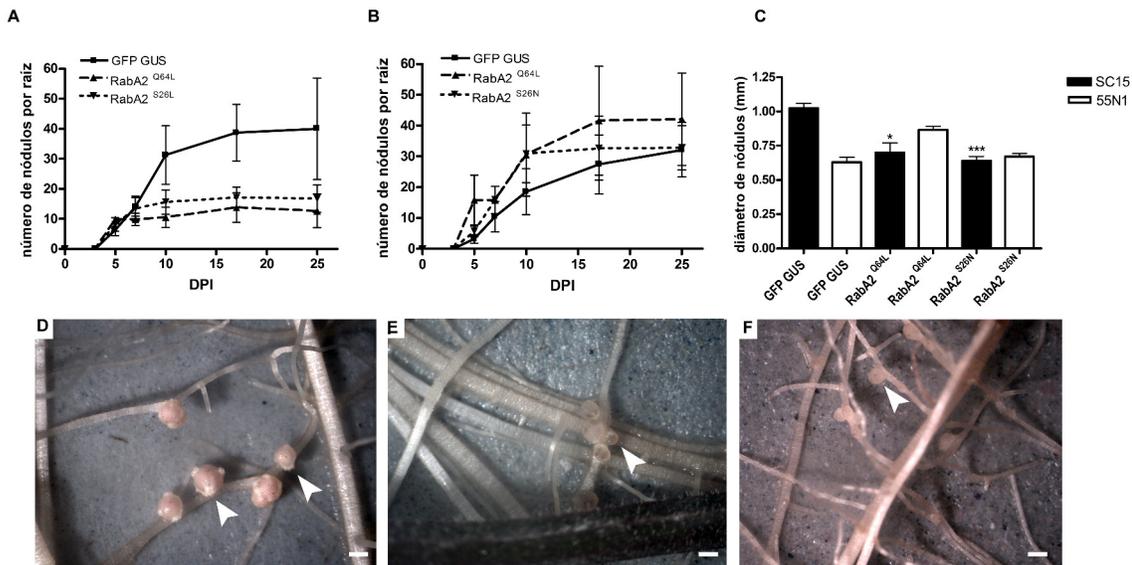


Figura 13. La expresión de *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N} afecta la nodulación con la cepa eficiente SC15 de *R. etli*. Promedio del número de nódulos por raíz \pm SEM cuantificado en un periodo de tiempo de 0 a 25 DPI con las cepas de *R. etli* SC15 (A) o 55N1 (B) en más de 10 raíces transgénicas independientes de 7 plantas compuestas RAB2^{Q64L}, RabA2^{S26N} y GFP GUS. Se detectaron diferencias significativas entre las raíces de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} de acuerdo al *t-test* de Student con $P < 0,05$. DPI: días post infección. C. Diámetro de los nódulos a los 18 DPI en raíces transgénicas de RAB2^{Q64L}, RabA2^{S26N} y GFP GUS inoculadas con la cepa SC15 (barras negras) o 55N1 (barras blancas). Las barras representan la media y SEM de dos réplicas biológicas, $n \geq 30$ para cada condición analizada. Los asteriscos indican significancia estadística de acuerdo al *t-test* de Student con $P < 0,05$. D-F. Fotografía de nódulos a los 18 DPI de plantas compuestas que expresan GFP GUS (D), RabA2^{Q64L} (E) o RabA2^{S26N} (F). Algunos de los nódulos de menor tamaño y sin lenticelas están indicados con puntas de flecha blancas en E y F. Las puntas de flechas blancas indican nódulos, que solamente presentan lenticelas en las plantas compuestas GFP GUS. Barra= 1 mm.

Con el fin de evaluar en mayor detalle las alteraciones en los nódulos formados por la cepa SC15 en las raíces con expresión de las formas mutantes de *RabA2*, se analizaron cortes semifinos y ultrafinos de nódulos de 21 DPI por microscopía óptica de campo claro y electrónica, respectivamente. La microscopía de campo claro de los nódulos pequeños de RAB2^{Q64L} (figura 14 B y E) y RabA2^{S26N} (figura 14 C y F) permitió detectar células corticales de morfología irregular con un menor número de simbiosomas, en comparación con las células corticales completamente ocupadas por bacteroides de los nódulos formados en las plantas control (figuras 14 A y D). La microscopía electrónica se utilizó para evaluar cambios ultraestructurales en las células corticales infectadas. En los nódulos de GFP GUS se

observaron bacteroides elongados y rodeados por la membrana del simbiosoma, inmersos en un citoplasma denso (figura 14 G). Sin embargo, en los nódulos de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} se observaron membranas del simbiosoma desintegradas y bacteroides libres en un citoplasma menos denso y desorganizado (figura 14 H e I, respectivamente). El fenotipo detectado en nódulos desarrollados con la cepa SC15 en las mutantes RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} es compatible con una senescencia temprana de los nódulos. Sin embargo, la senescencia temprana podría ser consecuencia de alteraciones en la infección de los nódulos.

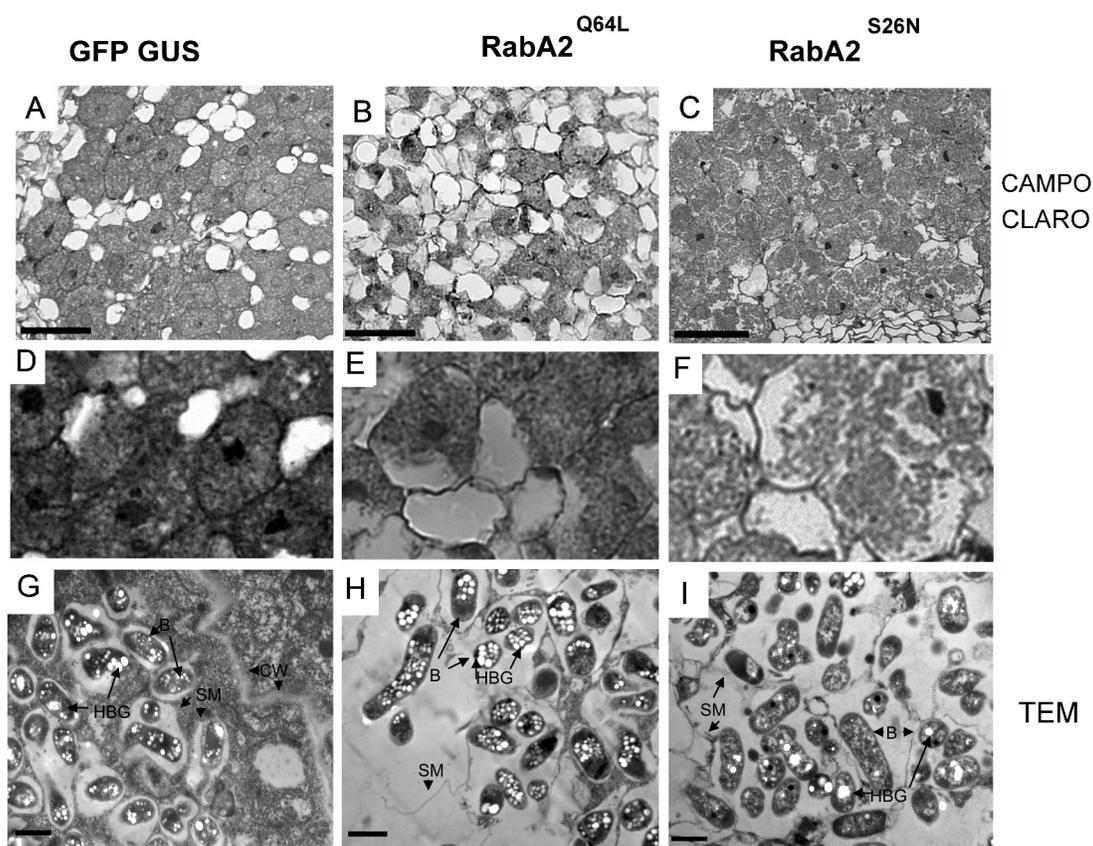


Figura 14. Citología de nódulos de plantas compuestas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}. A-C. Imágenes de secciones semifinas de nódulos de 21 DPI con la cepa de *R. etli* SC15 de plantas compuestas GFP GUS (A y D), RabA2^{Q64L} (B y E) y RabA2^{S26N} (C y F). Barras A-C = 50 μ m. D-F. Detalle de la zona infectada de nódulos. Barras D-F= 25 μ m G-I. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas de nódulos de plantas compuestas GFP GUS (G) RabA2^{Q64L} (H) o RabA2^{S26N} (I). CW: pared celular, B: Bacteroide, SM: membrana de simbiosoma, HBG: gránulos de poli- β hidroxi-butirato. Barras G-I= 1 μ m.

RabA2 participa en la preferencia de cepas de rizobios en un cultivar mesoamericano

Los resultados del análisis de nodulación sugieren que la expresión de las formas mutantes de *RabA2* afecta la interacción más eficiente con la cepa SC15. Para corroborar la participación de RabA2 en la especificidad de cepa, se realizaron experimentos de competencia coinoculando con las cepas de *R. etli* 55N1 y SC15 en plantas GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}. Previamente se describió que la inoculación de raíces de *P. vulgaris* de origen Mesoamericano con una mezcla de cepas portadoras del alelo *nodC-α* y del alelo *nodC-δ* desarrollan nódulos ocupados preferentemente por cepas portadoras del alelo *nodC-α* (Aguilar et al., 2004). A los 21 DPI se recolectaron aproximadamente 100 nódulos por cada construcción, se aisló el DNA bacteriano y se procedió a realizar un análisis del polimorfismo del gen *nodC* (figura 15 A). En este ensayo se detectó que los nódulos de plantas compuestas GFP GUS estaban ocupados en un 82 % por la cepa SC15 y un 16 % por la cepa 55N1. Además, se observó que el 2 % de los nódulos estaban coocupados por ambas cepas. Este resultado coincide con los resultados previamente descritos para cultivares Mesoamericanos de *P. vulgaris* salvaje (Aguilar et al., 2004). En contraste, los nódulos de RabA2^{Q64L} presentaron una reducción del 30 % de ocupación de la cepa SC15 (*nodC-α*) y un incremento del 13 % de la cepa 55N1 (*nodC-δ*) respecto de los valores del control GFP GUS. Llamativamente, se detectó que el 21 % de los nódulos de las plantas compuestas RabA2^{Q64L} se encontraban coocupados por ambas cepas (figuras 15 B). Por otro lado, en plantas RabA2^{S26N} se cuantificó una coocupancia del 4 % y no se observaron cambios en la ocupación de nódulos con las cepas SC15 y 55N1 respecto del control GFP GUS. Estos resultados indican que la expresión de *RabA2*^{Q64L} afecta la ocupación de nódulos descrita para esta variedad de *P. vulgaris*, aportando evidencia a favor del rol de RabA2 en la preferencia de cepas por parte de la planta. A su vez, el aumento de nódulos coocupados sugiere que la regulación anormal de RabA2 resulta en defectos en el proceso de infección.

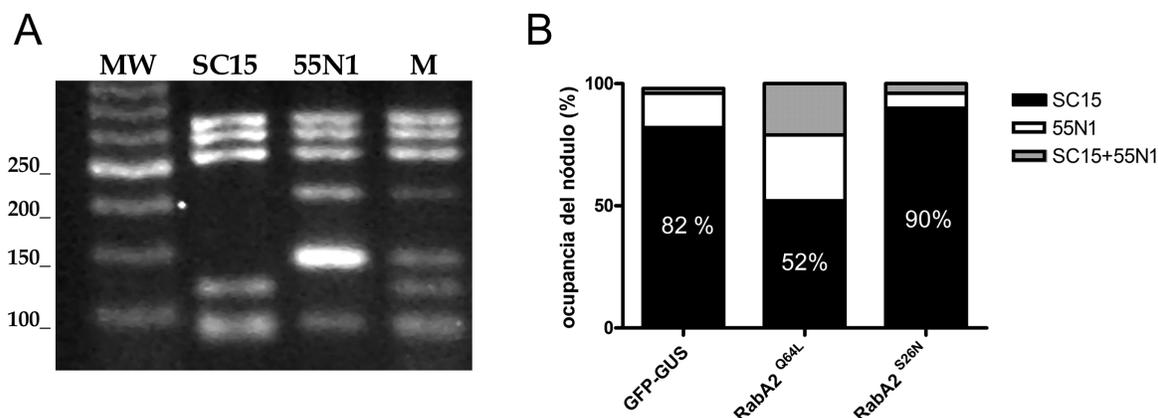


Figura 15. Análisis de ocupación de nódulos en raíces transgénicas de plantas compuestas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} inoculadas con las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. A. Polimorfismo del gen *nodC* observado mediante la digestión de productos de PCR. Calle 1: marcador de peso molecular (MW). Calle 2: perfil del polimorfismo del alelo *nodC-α* de la cepa de *R. etli* SC15. Calle 3: perfil del polimorfismo del alelo *nodC-δ* correspondiente a la cepa de *R. etli* 55N1. Calle 4: perfil de los polimorfismos encontrados en nódulos coocupados por las cepas SC15 y 55N1 (M). **B.** Porcentaje de ocupación de nódulos a los 21 DPI por las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. Los eventos de co-ocupancia son indicados como SC15+ 55N1. El análisis se realizó con un ≥ 100 nódulos, con un mínimo de 10 plantas coinoculadas por cada construcción.

RabA2 participa en la formación del hilo de infección

Previamente se describió que en plantas silenciadas en *RabA2* no hay formación del IT luego de la inoculación con *R. etli* y que RabA2 era necesario para inducir eventos tempranos de la nodulación previos a la formación del IT (Blanco et al., 2009). Por otro lado, la sobreexpresión no afectó los procesos de infección y organogénesis. Sin embargo no fue posible determinar si el silenciamiento afectó las vías de señalización que determinan el inicio y progreso del IT. Considerando los mecanismos de regulación de las GTPasas y su participación en la remodelación de membrana y tráfico de vesículas, en el presente trabajo se propuso evaluar la participación de RabA2 en la formación del IT mediante la sobreexpresión de formas mutantes de RabA2. Para analizar la posible función de esta GTPasa en el proceso de infección, se cuantificó la formación de ITs a los 7 DPI utilizando la cepa CFNX5 (*nodC-α*) de *R. etli* que expresa la proteína fluorescente DsRed, previamente obtenida en nuestro laboratorio (Battaglia et al., 2014). El número de ITs formados no difirió significativamente entre plantas GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} (figura 16 A). Paralelamente, los ITs fueron clasificados considerando su progreso en la infección (figura 16 B): detenidos en el pelo radical (figura 16 C), la epidermis (figura 16 D), o que hubieran progresado hasta el córtex (figura 16 E).

Aproximadamente el 61 % de los ITs de las raíces control GFP GUS progresó hacia las células corticales, indicando una correcta formación y desarrollo del IT. Sin embargo, en las raíces transgénicas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} sólo un 27 % y 33 % de los ITs progresaron hacia el córtex, mientras que un 73 % y 67 % estaban detenidos en los pelos radicales o la epidermis en las plantas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}, respectivamente. En contraste, en el control GFP GUS, sólo un 40 % de los ITs se localizaron en el pelo radical o la epidermis (figura 16 B).

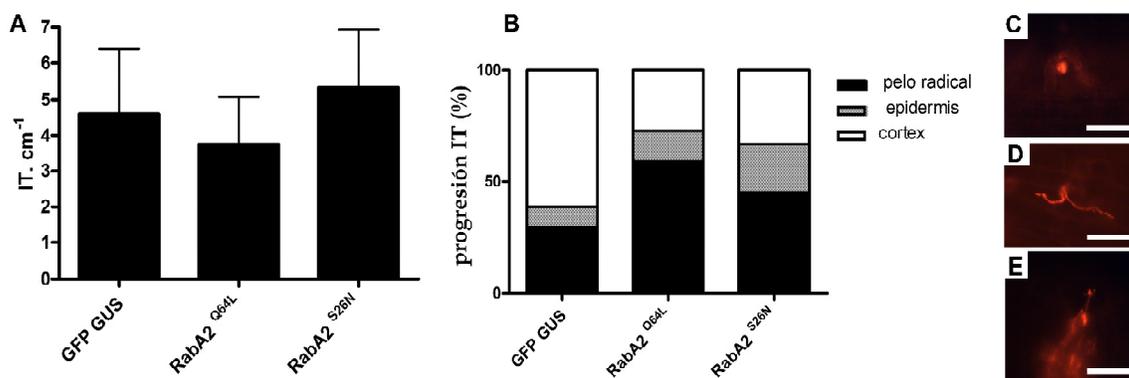


Figura 16. La expresión de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} afecta el progreso del IT. A. Cuantificación de ITs por cm de raíz lateral desarrollados por la cepa de *R. etli* CFNX5 DsRed a los 7 DPI. Las barras indican el SEM. El análisis se realizó en más de 10 raíces independientes de plantas compuestas RabA2^{Q64L}, RabA2^{S26N}, y control GFP GUS. El número de ITs analizados fue mayor a 50 en cada muestra analizada B. Clasificación de ITs (medido en % respecto del total de ITs) considerando el progreso de la infección: localizados en el pelo radical, epidermis, o córtex. C-E. Microscopía de fluorescencia de ITs representando las categorías de clasificación utilizadas en (B) a los 7 DPI con la cepa de *R. etli* CFNX5 DsRed. C.IT detenido en el pelo radical; D. IT detenido en la epidermis. E. IT penetrando en el córtex. Barra C-E = 50 μ m.

Durante la cuantificación de los ITs se observó que las raíces que expresan las formas mutantes de *RabA2* presentaron ITs que diferían de los ITs desarrollados en las raíces GFP GUS. Algunos de los tricoblastos de las raíces de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} presentaron fluorescencia roja en el citoplasma, sugiriendo una pérdida de la integridad del IT y liberación prematura de la bacteria fluorescente (figura 17 A-C). Estos eventos no fueron considerados para la cuantificación presentada en la figura 16 B. En su mayoría, estos ITs quedaban detenidos en el pelo radical (figura 17 D-E), aunque en algunos casos se observó que una de las ramificaciones del IT alcanzaba la epidermis (figura 17 F) o llegaban a infectar

las células corticales, indicando que algunos de estos eventos de infección fueron capaces de alcanzar las células del primordio de nódulo (figura 17 G).

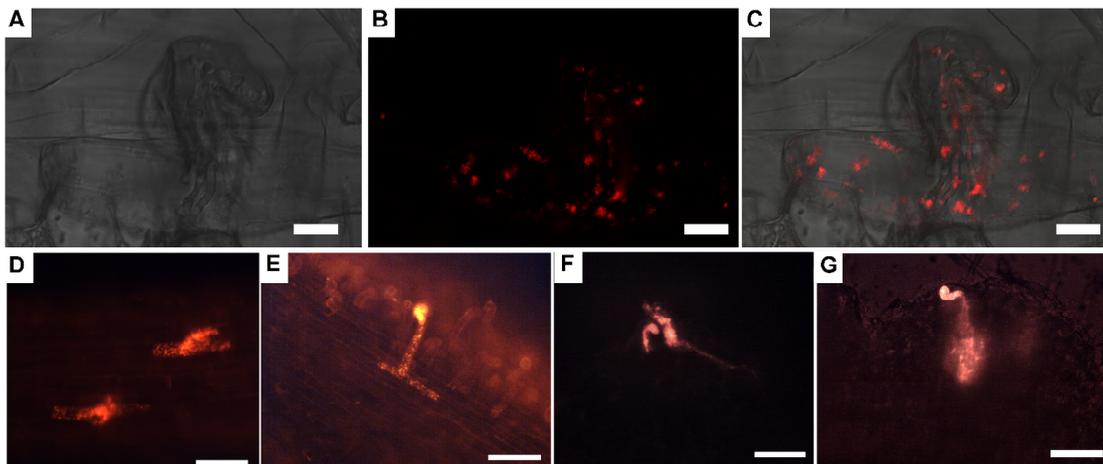


Figura 17. La desregulación de RabA2 afecta la integridad del IT. A-C. Evento de infección anormal (ramificado en el tricoblasto y con liberación prematura de bacteria fluorescente en el citoplasma) observado en raíces de plantas compuestas RabA2^{Q64L} a los 7 DPI con la cepa CFNX5 DsRed de *R. etli*. Las imágenes corresponden a campo claro (A) fluorescencia (B) y la combinación de ambas imágenes (C). Barra = 100 μ m. D-G. ITs que presentan liberación de bacterias en el citoplasma del pelo radical en raíces de plantas compuestas RabA2^{S26N} y RabA2^{Q64L}. La mayoría de estas infecciones se encontraron abortadas en pelo radical (D y E), pero algunas infecciones se identificaron en epidermis (F) o en menor proporción asociadas a córtex (G). Estas categorías fueron utilizadas para la cuantificación presentada en la tabla 1. Barra = 50 μ m.

En las raíces de plantas compuestas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} se registró un 11 % y un 16 % de ITs con este fenotipo de liberación prematura de la bacteria en el pelo radical y en la epidermis (figura 17 A-F, tabla 1), mientras que el porcentaje de IT afectados en algunas de las ramificaciones pero que liberan bacteria en el córtex fue de un 4 % y 2 %, respectivamente (figura 17 G, tabla 1). Estos eventos de infección no fueron observados en el control GFP GUS (tabla 1), sugiriendo que la actividad de RabA2 es necesaria para la progresión del IT hacia el córtex y para mantener la integridad de la membrana del IT, aunque no afecta el inicio de la infección.

Tabla 1. La expresión de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} genera ITs con liberación prematura de bacteria en el citoplasma del pelo radical.

Porcentaje de ITs con fluorescencia en el pelo radical % ^(a)			
Progresión IT Construcción	Pelo radical	Epidermis	Córtex
GFP GUS	0	0	0
RabA2 ^{Q64L}	10	1	4
RabA2 ^{S26N}	14	2	2

^(a) Porcentaje de pelos radicales con eventos de infección con liberación prematura de bacteria fluorescente. Este fenotipo fue clasificado en base a la progresión de los ITs: arrestados en pelo radical, epidermis o arrestados en córtex (ver Figura 17). La clasificación se realizó a los 7 DPI con la cepa de *R. etli* CFNX5 que expresa la proteína fluorescente DsRed.

Localización subcelular de las fusiones traduccionales GFP-RabA2^{WT}, GFP-RabA2^{Q64L} y GFP-RabA2^{S26N}

Considerando el fenotipo de infección observado en las plantas compuestas RabA^{Q64L} y RabA2^{S26N}, se propuso evaluar la localización subcelular de RabA2 y sus formas mutantes durante la formación y progresión del IT. Para cumplir con este objetivo, se generaron plantas compuestas que expresan las proteínas de fusión GFP-RabA2^{WT}, GFP-RabA2^{Q64L}, GFP-RabA2^{S26N} o la proteína GFP soluble como control. El control de autofluorescencia de pared y del IT se realizó con raíces de *P. vulgaris* no transformadas. Para la identificación de ITs se utilizó la cepa de *R. etli* CFNX5 que expresa la proteína fluorescente DsRed y a los 8 DPI las raíces fueron analizadas por microscopía confocal de fluorescencia (figura 18).

El análisis mostró que las fusiones GFP-RabA2^{Q64L}, GFP-RabA2^{S26N} y GFP-RabA2^{WT} se localizan alrededor del IT, en la membrana del pelo radical y rodeando la señal fluorescente de la bacteria (figura 18 G-O). Si bien se observó una señal fluorescente en el canal verde que se superpone con la fluorescencia roja derivada de la presencia de DsRED en la bacteria, en las raíces no transformadas o transformadas con GFP, esta fue de baja intensidad comparada con las raíces que expresan las formas fluorescentes de RabA2, y nunca se visualizó una señal asociada a la membrana o alrededor del IT (figuras 18 A-F). Por lo tanto, los controles de auto fluorescencia (figura 18 A-C) y GFP (figuras 18 D-F) permitieron confirmar la especificidad de la señal de GFP asociada a membrana, pared e IT en raíces transgénicas que expresan la fusión GFP-RabA2^{WT} y las versiones mutantes GFP-RabA2^{Q64L} y GFP-RabA2^{S26N}.

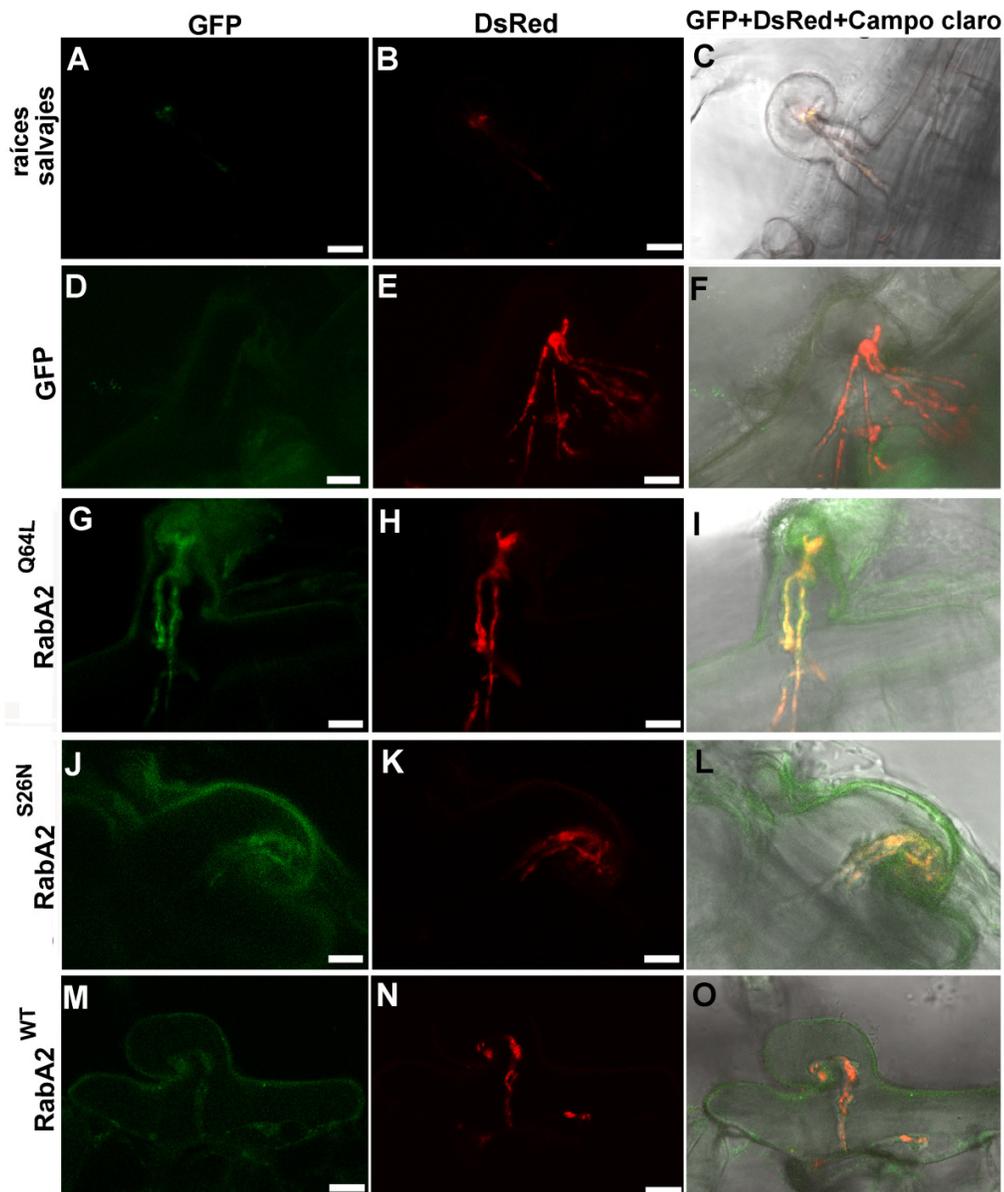


Figura 18. La fusión GFP-RabA2 se localiza alrededor de la membrana y en el IT. Raíces transgénicas que expresan las fusiones traduccionales GFP-RabA2^{Q64L}, GFP-RabA2^{S26N}, GFP-RabA2^{WT} o GFP soluble y raíces sin transformar fueron inoculadas con la cepa CFNX5 de *R. etli* que expresa la proteína fluorescente DsRed. (A-C). La señal de auto fluorescencia del IT en raíces de plantas salvajes de *P. vulgaris* en el canal de GFP es baja respecto de la fusión GFP-RabA2^{WT} y sus versiones mutantes. En el control de raíces transgénicas con expresión de GFP soluble no se observó localización de GFP alrededor del IT (D). Las fusiones GFP-RabA2^{Q64L} (G-I), GFP-RabA2^{S26N} (J-L) y GFP-RabA2^{WT} (M-O) se localizan en la membrana plasmática del pelo radical, la membrana del IT y alrededor de la señal de fluorescencia de la bacteria. Barras = 10 μ m

Previamente se describió que RabA2^{WT} se localiza preferentemente en vesículas asociadas a la periferia del pelo radical y luego de 24 HPI de la inoculación del rizobio, en vesículas

localizadas en la zona de deformación del pelo radical (Blanco et al., 2009). Para estudiar la localización de RabA2 durante la formación del IT, se observó la progresión temporal del tráfico de vesículas marcadas con GFP-RabA2^{WT} en un pelo radical que presentaba un IT desarrollado por la infección de la cepa de *R. etli* CFNX5 marcada con la proteína fluorescente DsRed (figura 19). Se pudo detectar un intenso tráfico de vesículas marcadas con GFP-RabA2^{WT} asociadas a la membrana plasmática y al IT. También se observó el movimiento de vesículas marcadas con GFP-RabA2^{WT} a lo largo de puentes citoplasmáticos que conectan la membrana plasmática con el IT en crecimiento (figura 19 A, indicado con una punta de flecha blanca).

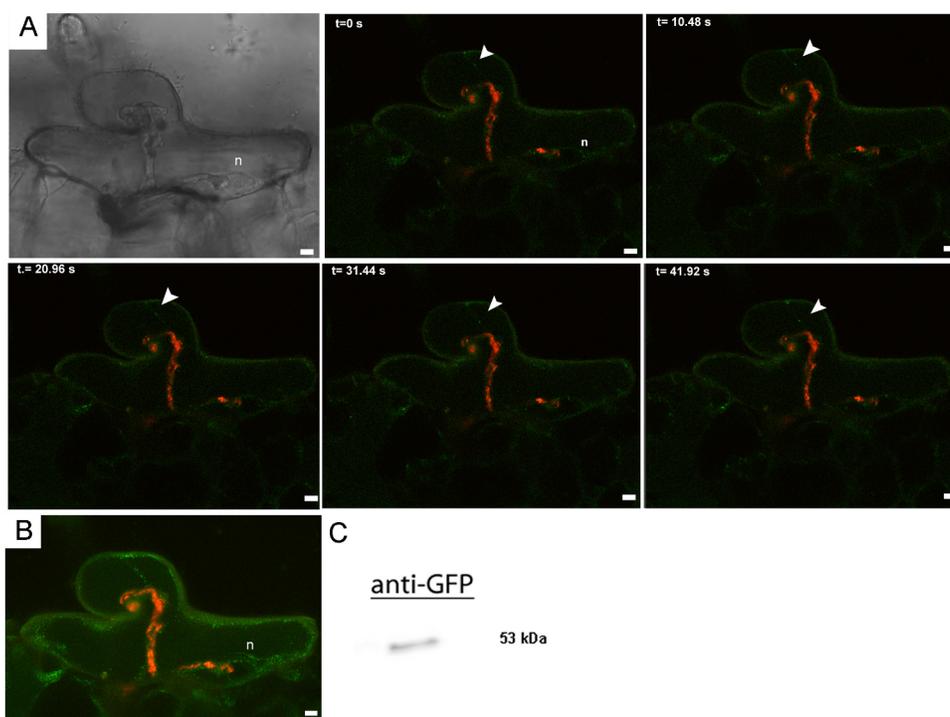


Figura 19. GFP-RabA2^{WT} se localiza en vesículas móviles asociadas a la membrana plasmática y al IT. A. Secuencia temporal de la fluorescencia de un tricoblasto que expresa la proteína GFP-RabA2^{WT} luego de la inoculación con la cepa CFNX5 de *R. etli* transformada con la proteína fluorescente DsRed. La punta de flecha blanca indica una vesícula marcada que se mueve a lo largo de un canal intravacuolar o puente citoplasmático que conecta la membrana citoplasmática y el IT en crecimiento. El primer panel corresponde al campo claro, mientras que los siguientes muestran la superposición de los canales de fluorescencia roja y verde **B.** La máxima proyección de las imágenes del IT de la figura 10 permitió visualizar la presencia de vesículas marcadas con GFP-RabA2^{WT} y el IT desarrollado por la infección de CFNX5 DsRed a los 8 DPI. Se pudo observar que GFP-RabA2^{WT} se localiza en vesículas asociadas a la membrana plasmática que se conectan con el IT a través de puentes citoplasmáticos, en el IT y en el retículo endoplasmático alrededor del núcleo. La integración se realizó con el software *LEICA-LAS AF Lite* Barras: 5 μ m, n = núcleo. **C.** Ensayo de *Western blot* a partir de un extracto proteico de raíz de plantas compuestas GFP- RabA2^{WT}. El revelado con un anticuerpo anti-GFP mostró una banda de aproximadamente 53 kDa correspondiente a la proteína de fusión.

La integración de las imágenes tomadas en el tiempo permitió visualizar con mejor resolución y confirmar el flujo de vesículas marcadas con GFP-RabA2^{WT} en posibles puentes citoplasmáticos entre la membrana plasmática y el IT y en el RE alrededor del núcleo (figura 19 B). Para corroborar la correcta expresión e integridad de la fusión, se realizó un ensayo de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP a partir de extracto proteico de raíz de plantas compuestas GFP-RabA2^{WT} y se detectó una banda de 53 kDa, correspondiente a la proteína GFP-RabA2^{WT}, confirmando así la integridad de la fusión (figura 19 C). La localización en vesículas no se observó en el caso de las formas mutantes GFP-RabA2^{Q64L}, GFP-RabA2^{S26N}, donde la señal fue predominantemente citoplasmática (figura 18 G-L). Este resultado es consistente con lo reportado para otras GTPasas monoméricas, en las que las formas asociadas a GDP y GTP pierden su localización en vesículas (Chow et al., 2008). Asimismo, las imágenes permitieron evaluar la localización del núcleo dentro del pelo radical. El núcleo antecede el crecimiento del IT y se mueve acompañando su progresión (Gage, 2004). En las células que expresan GFP-RabA2^{WT} se observó fluorescencia alrededor del núcleo, sugiriendo que la proteína de fusión también se localiza en el retículo endoplasmático/vía secretoria (figura 19 A y B).

En conjunto, el uso de formas mutantes afectadas en la regulación post-traducciona l de *RabA2* permitió mostrar que esta GTPasa monomérica participa en la respuesta específica de cepa, mientras que el fenotipo de infección sugiere una participación de RabA2 en el transporte de vesículas implicadas en el crecimiento polar asociado a la progresión del IT.

CAPÍTULO II

Análisis de la GTPasa monomérica ARFA1 en procesos de crecimiento polar y en la nodulación en *M. truncatula*

Capítulo II. Análisis de la GTPasa monomérica ARFA1 en procesos de crecimiento polar y en la nodulación en *M. truncatula*

Identificación de genes coexpresados con *RabA2* en *M. truncatula*

Teniendo en cuenta el rol establecido para RabA2 durante la nodulación, el siguiente objetivo fue identificar otras proteínas que puedan formar parte del mismo proceso. Con este fin se realizó un *screening* de una biblioteca de doble híbrido de levadura para identificar proteínas que interaccionaran físicamente con RabA2 o la forma asociada a GTP, RabA2^{Q64L} por considerar que adopta la conformación correcta para interactuar con posibles efectores. A pesar de reiterados intentos, no se obtuvieron clones positivos, por lo que fue necesario plantear una estrategia diferente. Utilizando la base de datos de expresión *Gene Expression Atlas* de *M. truncatula* (<http://mtgea.noble.org/v3/index.php>), que contiene datos de expresión de distintos tejidos y estadios de la nodulación provenientes de microarreglos de *Affymetrix* de Medicago (Benedito et al., 2008), realizamos la búsqueda de genes coexpresados con *RabA2*, con la hipótesis de que aquellos genes que forman parte de un mismo proceso biológico pueden ser regulados a nivel transcripcional de una forma similar. Entonces, a partir de la secuencia de cDNA de *RabA2* de poroto (Phvul.011G061100) se utilizó el algoritmo BLASTn en la base de datos. Este análisis permitió determinar que el gen Medtr3g069510 (identificador Mtr.8716.1.S1_at) corresponde al gen con mayor identidad de secuencia a nivel de nucleótidos ($E=2e^{-61}$) a *RabA2* de poroto. El análisis *in silico* de coexpresión permitió obtener una lista de 100 genes con un coeficiente de correlación de Pearson superior a 0,9 (Anexo II, tabla suplementaria 1). El identificador con mayor índice de coexpresión con RabA2 (figura 20) corresponde al gen Medtr5g034130, que codifica para una GTPasa monomérica de tipo ARFA1.

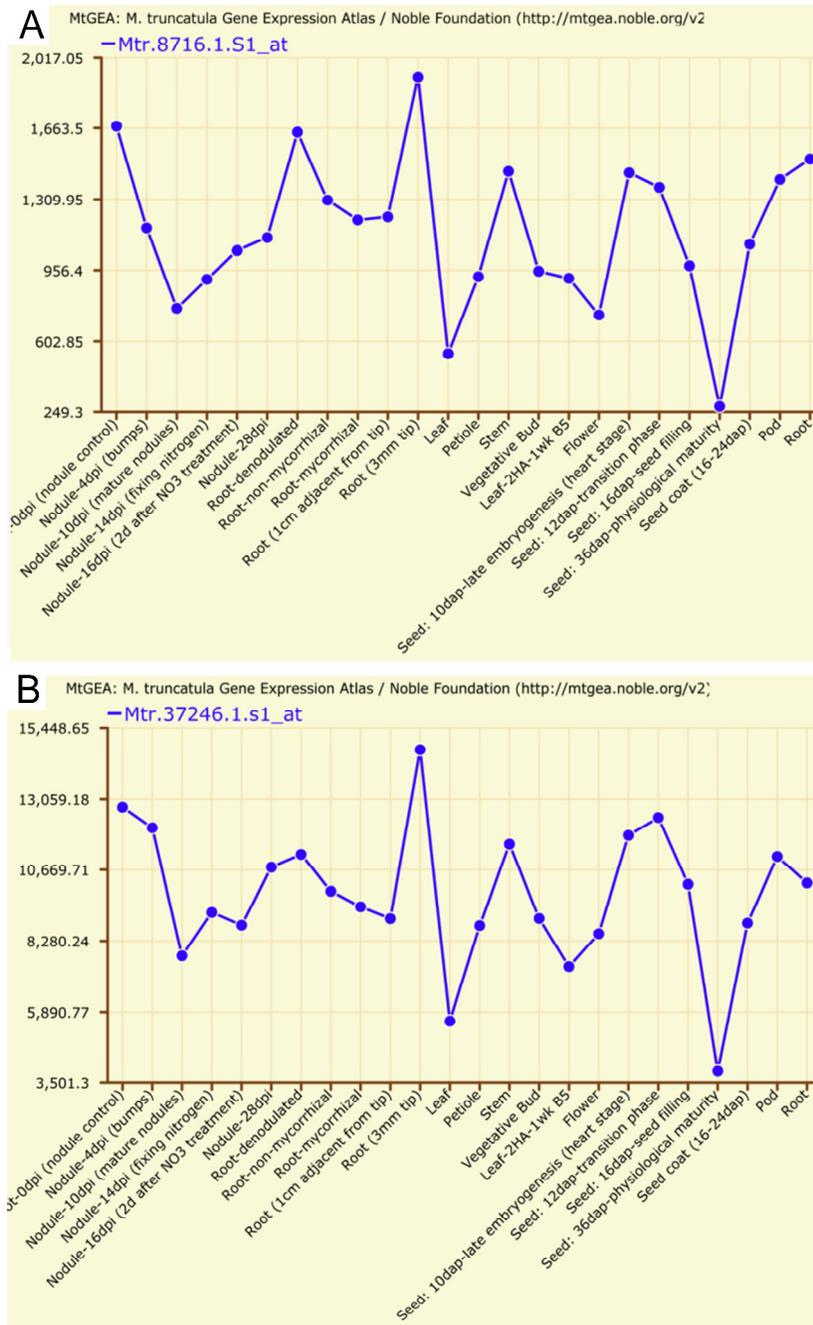


Figura 20. Perfil de expresión de Mtr.8716.1.S1_at (MtRabA2) y Mtr.37246.1.S1_at (ArfA1a) en *M. truncatula*. Perfil de expresión de Mtr.8716.1.S1_at, correspondiente al gen *RabA2* (A) y Mtr.37246.1.S1_at correspondiente al gen Medtr5g034130, que codifica para la GTPasa monomérica ARFA1a (B). Los valores de expresión normalizados provienen del *Medicago Gene Expression Atlas* y se presentan en unidades arbitrarias. En el eje X se indican los tejidos u órganos seleccionados para el análisis.

La clasificación funcional de los 100 genes identificados mostró que el 40 % de los mismos están involucrados en el tráfico de vesículas (figura 21). El 60 % restante de los genes corresponden a procesos de transducción de señales (14 %), funciones del metabolismo primario (11 %) y otras categorías, como por ejemplo el procesamiento de proteínas, transporte, respuesta redox y a estrés, proteínas integrales de membrana, procesamiento de RNA, procesamiento de proteínas, citoquinesis, y función desconocida, todas ellas con porcentajes menores al 10 %. Los genes clasificados dentro de la categoría de tráfico de vesículas participan en las distintas etapas del proceso, como son la formación de la vesícula por gemación, el transporte asociado al citoesqueleto, el reconocimiento de la membrana destino, anclaje y posterior fusión con el compartimiento subcelular de destino. Se identificaron dos GTPasas monoméricas de la familia ARF, proteínas adaptadoras del tipo AP (median el anclaje de las proteínas de cubierta y la selección de las proteínas cargo), una proteína de cubierta del tipo gamma (participa en el transporte de Golgi a retículo endoplasmático), la proteína de cubierta clatrina (forma la cubierta de las vesículas del TGN y endocíticas) y dinamina (fisión de las vesículas para completar la gemación), entre otros. Respecto de los procesos posteriores dentro del transporte de vesículas, tales como el reconocimiento de la membrana donora y posterior fusión, se encontraron una GTPasa Rab YP (transporte), un NSF (factor soluble sensible a *N-etilmaleimide*), Sec15, SNAPs (proteínas adaptadoras de NSF), receptores de SNAP (denominados SNAREs) y vavirinas (proteínas asociadas a vesículas). La clasificación funcional de los genes coexpresados con RabA2 sugiere que diferentes componentes asociados al proceso de tráfico de vesículas pueden estar sujetos a mecanismos de regulación coordinados y que dichos componentes podrían cumplir una función durante el proceso de nodulación.

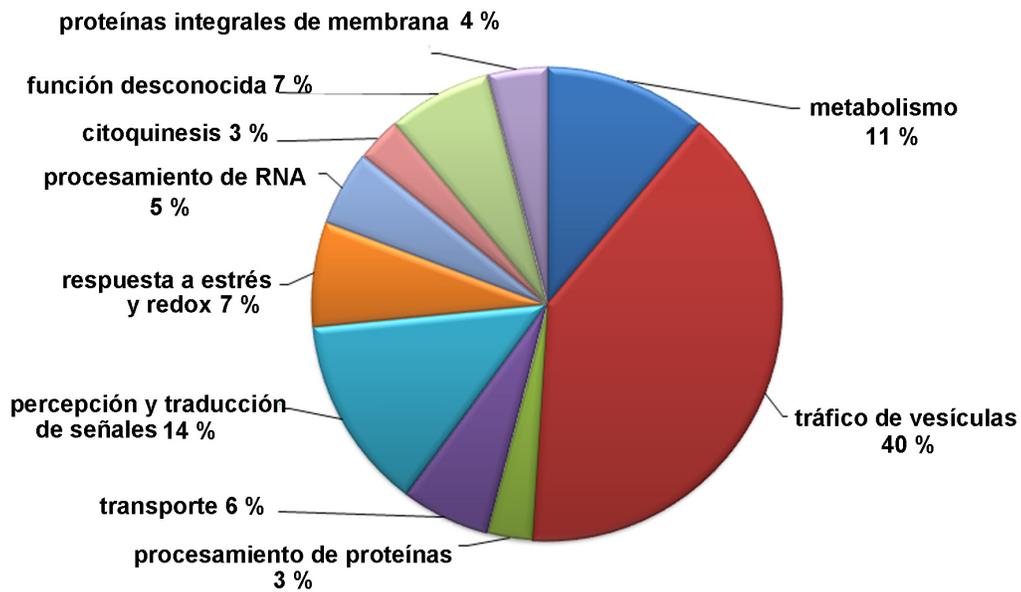
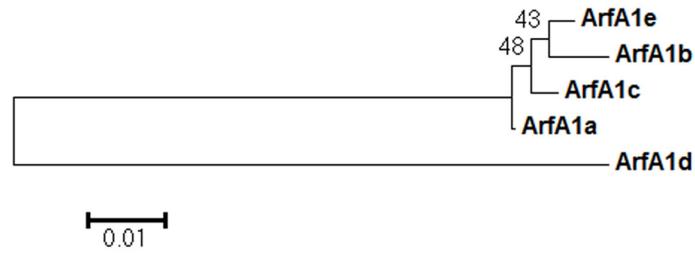


Figura 21. Clasificación funcional de los genes coexpresados con RabA2 de *M. truncatula*. La clasificación se realizó en base a las anotaciones funcionales (GO, *Gene Ontology*) de los 100 genes con mayor coeficiente de coexpresión con RabA2. El 40 % de los genes coexpresados con RabA2 de *M. truncatula* codifican proteínas involucradas en el tráfico de vesículas. El 60 % de los identificadores restantes se distribuyeron en las categorías de transducción de señales, procesos de óxido reducción y respuesta a estrés, transporte, procesamiento de proteínas, procesamiento de RNA, citoquinesis, proteínas integrales de membrana, metabolismo primario y función desconocida.

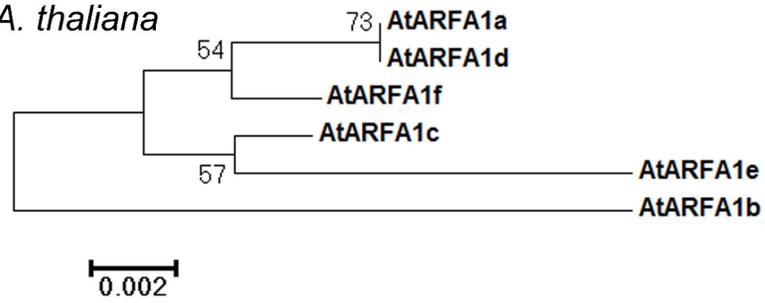
Medtr5g034130 codifica para una GTPasa monomérica de la familia ARFA1

En el genoma de *M. truncatula* se identificaron 15 secuencias de proteínas ARF que se asocian en 5 clados (Savy, Dalla Vía y Blanco, trabajo no publicado). La secuencia de Medtr5g034130 fue ubicada en el clado ARFA1, que está representado por 5 miembros (figura 22 A). En *A. thaliana* y *P. vulgaris* el clado ARFA1 está representado por 6 miembros (figuras 22 B y C). Una característica distintiva del clado ARFA1 es la alta identidad de secuencia de aminoácidos entre las especies de *A. thaliana*, *M. truncatula* y *P. vulgaris*. En *M. truncatula* la identidad de secuencia comprendió un rango entre el 85 % y 99,4 % entre los distintos miembros (figura 22 D), coincidiendo con el análisis previamente reportado en *Arabidopsis* (Xu and Scheres, 2005).

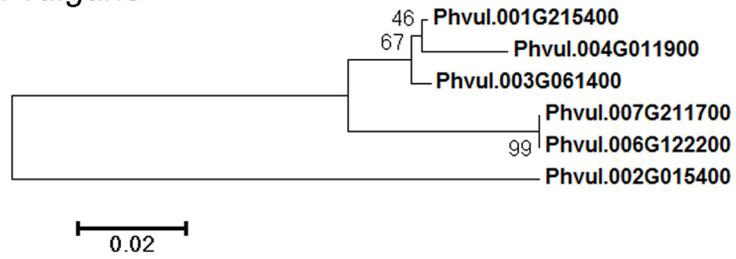
A *M. truncatula*



B *A. thaliana*



C *P. vulgaris*



D

```

ArfA1e 1 MGLSFTKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKN
ArfA1b 1 MGLSFTKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKN
ArfA1c 1 MGLTFTKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKN
ArfA1a 1 MGLTFTKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKN
ArfA1d 1 MGLTVSRIMRLFYAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKN

ArfA1e 61 ISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAV
ArfA1b 61 ISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAV
ArfA1c 61 ISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAV
ArfA1a 61 ISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAV
ArfA1d 61 VSFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRERILEARDELHRMLSEDEL RDA T

ArfA1e 121 LLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIANK
ArfA1b 121 LLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASK
ArfA1c 121 LLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASK
ArfA1a 121 LLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIANK
ArfA1d 121 LLVFANKQDLPNALSVSEITDKLGLHSLRQRHWYIQSTCATSGOGLYEGLDWLSNINSNK

ArfA1e 181 A-----
ArfA1b 181 VNKEKIFSETLLSYSFVMGCMKFN RV
ArfA1c 181 A-----
ArfA1a 181 A-----
ArfA1d 181 IR-----

```

Figura 22. Análisis filogenético de la subfamilia ARFA1 en *M. truncatula* (A), *A. thaliana* (B) y *P. vulgaris* (C). El análisis fue realizado con MEGA6 a partir de los alineamientos obtenidos con clustalW. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método Neighbor-joining. Los números representan los valores de bootstrap obtenidos de 10000 repeticiones. Cada árbol filogenético está diagramado en escala y las distancias de las ramas corresponden a distancias evolutivas. Las distancias evolutivas se consideran como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. **D.** Alineamiento múltiple de la familia ARFA1 de *M. truncatula*. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW. Los aminoácidos resaltados en negro corresponden a aminoácidos idénticos y los resaltados en gris a sustituciones de aminoácidos conservados. El porcentaje de identidad de secuencia comprendió un rango del 85 % y 99,4 %.

Niveles de expresión de los distintos miembros de la subfamilia ARFA1 en órganos y distintas condiciones bióticas en *M. truncatula*, *A. thaliana* y *P. vulgaris*.

Considerando la redundancia de los miembros de ARFA1 en *P. vulgaris*, *M. truncatula* y *A. thaliana*, se propuso analizar el patrón de expresión de cada uno de los miembros mediante un análisis *in silico*. Para cumplir con este objetivo, se utilizaron datos de microarreglos disponibles en el *Medicago eFP Browser*, datos de nuestro laboratorio de secuenciación masiva (Reynoso, Blanco, Zanetti, trabajo no publicado) y datos de secuenciación masiva de tejido de raíz de *P. vulgaris* sin inocular y 24 HPI con las cepa de *R. etli* SC15 y 55N1 (trabajo no publicado). Los datos extraídos de *Medicago eFP Browser* indicaron que los niveles de expresión de *ARFA1a* de *M. truncatula* (Mtr.33916.1.S1_at) no difirieron entre raíces sin inocular y raíces con nódulos recolectadas a distintos DPI. Además, se detectó expresión de *ARFA1a* (Mtr.33916.1.S1_at), *ARFA1b* (Mtr.37229.1.S1_at), *ARFA1c* (Mtr.11868.1.S1_s_at), *ARFA1d* (Mtr.6127.1.S1_s_at) y *ARFA1e* (Mtr.15007.1.S1_s_at) en todos los órganos analizados (figura 23). En el caso de *ARFA1d*, los niveles de expresión fueron bajos en tejido de raíz recolectado a distintos tiempos luego de la infección y se detectaron mayores niveles de expresión en los tejidos de la parte aérea de la planta. Los resultados sugieren que *ARFA1* se expresa ubicuamente en *M. truncatula*, no aumenta su expresión durante el desarrollo del nódulo y presenta un patrón de expresión similar a los otros miembros de la subfamilia ARFA1 en *Medicago*, excepto para el gen *ARFA1d*.

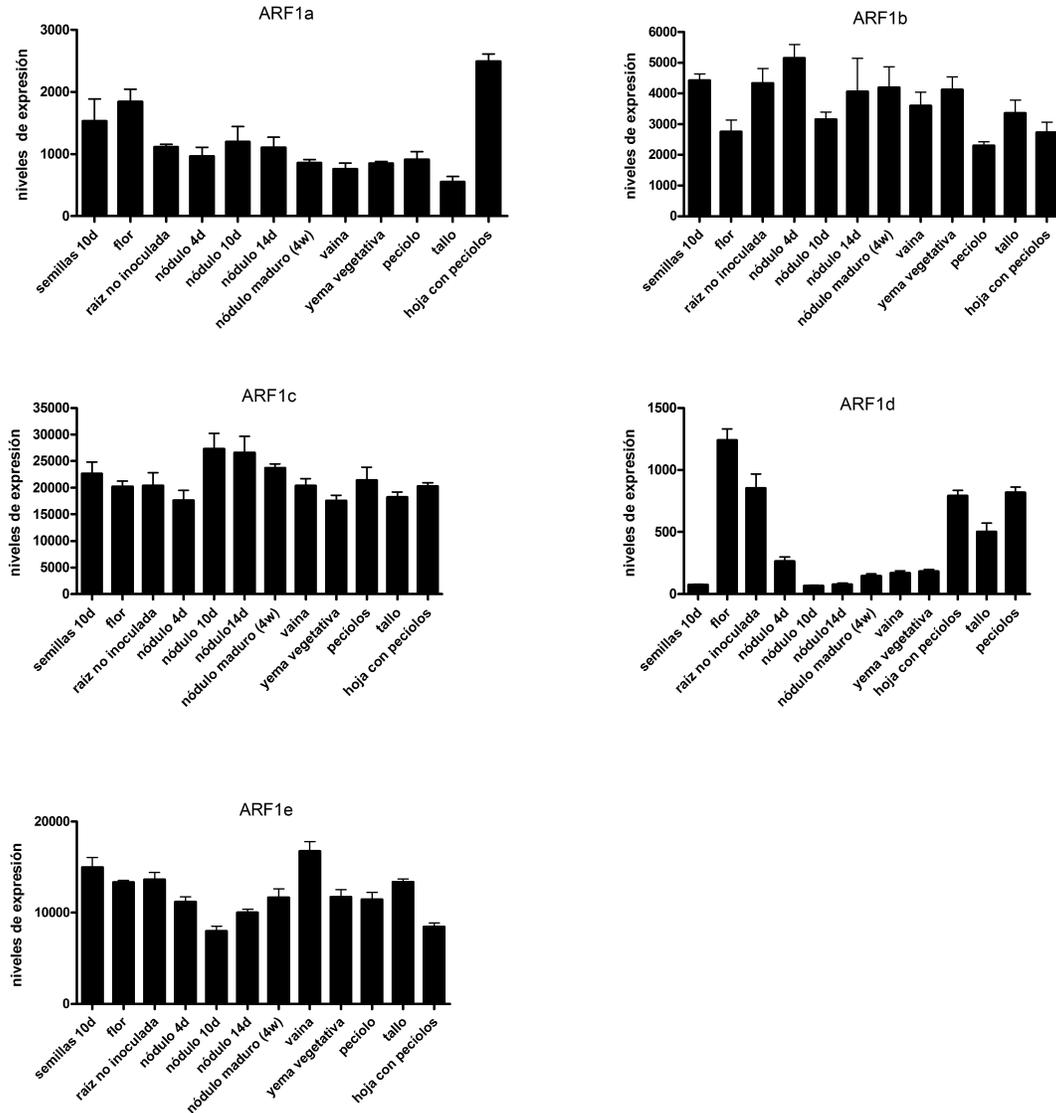


Figura 23. Niveles de expresión de los 5 miembros de la subfamilia ARFA1 en distintos órganos de *M. truncatula*. Análisis de expresión en *M. truncatula* de los genes *ARFA1* (Mtr.33916.1.S1_at), *ARFA1b* (Mtr.37229.1.S1_at), *ARFA1c* (Mtr.11868.1.S1_s_at), *ARFA1d* (Mtr.6127.1.S1_s_at), *ARFA1e* (Mtr.15007.1.S1_s_at), realizados con el *Medicago EF Browser* (<http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Los valores se encuentran en unidades arbitrarias derivadas de la normalización por los métodos MAS 5.0 y RMA (*Affymetrix*). Se seleccionaron para el análisis los datos correspondientes a semillas extraídas a los 10 días luego de la polinización (Semillas 10d), flor, raíz no inoculada, tejido de raíces con nódulos a los 4 DPI (4d), 10 DPI (10d), 14 DPI (14d), tejido de raíz con nódulos maduros de 4 semanas (nódulo maduro 4w), vaina, yema vegetativa, pecíolo, tallo y hoja con pecíolos. Las barras representan el promedio y el desvío estándar (SD).

El análisis de transcriptómica y traductoma realizado en *M. truncatula* en tejido de raíz sin inocular y 48 HPI con *S. meliloti* permitió evaluar los niveles de mRNA de los distintos miembros de ARFA1 (tabla 2) y comparar con los datos provenientes de microarreglos. El traductoma se obtuvo a partir mRNA asociado a polisomas por la técnica denominada TRAP, que permite detectar mRNAs que están siendo activamente traducidos (Reynoso et al., 2013), mientras que el análisis de transcriptómica se realizó con mRNA purificado por métodos convencionales. Ambos análisis permitieron concluir que no hay diferencias en los niveles de transcriptos cuantificados en las plantas inoculadas respecto de los controles, sugiriendo que estos genes no estarían sujetos a una regulación a nivel transcripcional o post-transcripcional en respuesta a la infección por *S. meliloti*. Los transcriptos de *ARFA1a*, *ARFA1c* y *ARFA1e* presentaron los mayores niveles de acumulación en raíz, mientras que los niveles de transcriptos de *ARFA1d* fueron los más bajos en este tejido. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Roux y colaboradores (Roux et al., 2014) y los datos de microarreglos disponibles en el *Medicago eFP Browser*.

Tabla 2. Valores de expresión de los distintos miembros de la subfamilia ARFA1 en *M. truncatula* a partir de datos de transcriptómica y traductoma ^(a).

Gen	Id	FPKM RNaseq			
		RNA total control	RNA total Sm	TRAP control	TRAP Sm
<i>MtARFA1a</i>	Medtr5g034130	343.8	413.2	414.6	413.7
<i>MtARFA1b</i>	Medtr7g109960	89.9	105.2	39.6	54.3
<i>MtARFA1c</i>	Medtr6g005820	1039.2	955.4	666.8	648.1
<i>MtARFA1d</i>	Medtr5g016540	12.2	11.6	10.6	12.2
<i>MtARFA1e</i>	Medtr1g086480	367.8	388.9	297.4	284.9

(a). Los valores, expresados como fragmentos por kilobase de transcripto por millón de lecturas (FPKM), provienen del análisis de transcriptómica realizado con mRNA total de *M. truncatula* y del análisis del traductoma realizado con mRNAs extraídos por la técnica TRAP (mRNA asociados a polisomas) correspondientes a tejido de raíz sin inocular (control) y tejido de raíz 48 HPI con *S. meliloti* (Sm) (Reynoso et al., 2013).

Los valores de expresión de la familia ARFA1 fueron evaluados en *P. vulgaris* a partir de datos de transcriptómica obtenidos con mRNA de raíces 24 HPI con la cepa de *R. etli* SC15 y de raíz sin inocular (tabla 3). Los niveles estimados de transcritos indicarían que el gen Phvul.004G011900 se encuentra inducido 24 HPI con las cepas SC15 y 55N1 de *R. etli*. Sin embargo, solamente se detectó una diferencia con significancia estadística en respuesta a la cepa SC15. Los resultados sugieren que este miembro de la familia ARFA1 participaría en el proceso de infección por rizobio. Sin embargo, los datos de expresión deben ser validados mediante RT-qPCR y su función estudiada mediante genética reversa.

Tabla 3. Valores de expresión de los 6 miembros de ARFA1 en *P. vulgaris* ^(a)

Gen	FPKM RNaseq		
	raíz sin inocular	raíz 24 HPI SC15	raíz 24 HPI 55N1
Phvul.002G015400	9.6	8.3	7.8
Phvul.001G215400	61	65.3	59.1
Phvul.004G011900	433.2	924.6	852.6
Phvul.006G122200	1.5	2.1	1.7
Phvul.003G061400	600.1	622.3	582.1
Phvul.007G211700	201.3	193.4	202.5

(a). Los valores de FPKM provienen del análisis de transcriptómica realizado con mRNA de *P. vulgaris* correspondientes a tejido de raíz sin inocular y tejido de raíz 24 HPI con la cepa SC15 o la cepa 55N1 de *R. etli*. FPKM: fragmentos por kilobase de transcritos por millón de lecturas. En negrita se indican los valores de FPKM correspondientes al miembro de la familia ARFA1 con expresión diferencial con significancia estadística (análisis realizado con *Cuffdiff*).

Localización subcelular de ARFA1 y colocalización con RabA2

Para evaluar la localización de ARFA1 y la posible colocalización con RabA2 en raíces de *M. truncatula* se generó la fusión ARFA1-RFP, clonando el marco abierto de lectura de *ARFA1e* en fase con *rfp* (*red fluorescent protein*) en el vector pK7WGR2 (Karimi et al., 2007), bajo el control del promotor 35S (35S: ARFA1-RFP). La fusión a RFP se realizó en el carboxilo terminal porque ARFA1 posee un sitio de miristoilación en el amino terminal que determina el anclaje lipídico en la membrana. La construcción fue introducida en *A. rhizogenes* y se generaron plantas compuestas de acuerdo al método de transformación de *M.*

truncatula (Boisson-Dernier et al., 2001). La marcación de ARFA1-RFP se detectó en estructuras puntuadas con un rango de tamaño de 2 a 3 μm localizadas en el citoplasma o asociadas a la membrana plasmática (figuras 24 y 25 B). Estas estructuras presentaron movilidad a lo largo del tiempo (figura 24, videos S1 y S2, Anexo II) y se localizaron alrededor del núcleo, posiblemente en la región del Golgi o el RE. La localización y la movilidad de estas estructuras concuerdan con los resultados descritos para ARFA1c en raíces de *Arabidopsis* (Xu and Scheres, 2005). Para evaluar la posible colocalización con RabA2, se cotransformaron raíces de *M. truncatula* con las construcciones ARF-RFP y GFP-RabA2^{WT} de acuerdo al protocolo de transformación de *M. truncatula* y las raíces transgénicas resultantes fueron analizadas por microscopía confocal. La marcación de la mayoría de las estructuras vesiculares que presentaron la fluorescencia correspondiente a RFP (figura 25 B y E), colocalizaron con la fluorescencia de GFP (figura 25 C), mientras que una subpoblación de estas vesículas con un tamaño entre 1-2 μm presentó sólo marcación para GFP-RabA2^{WT} (figura 25 C, indicadas con flechas). Las vesículas muestran una superposición de las señales de fluorescencia en toda la vesícula (figura 25 F).

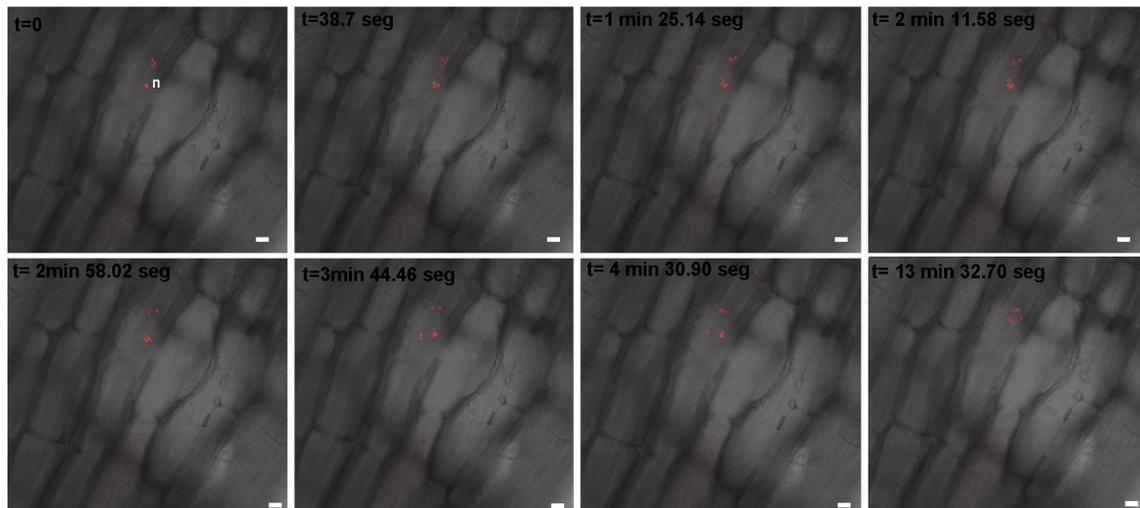


Figura 24. ARFA1-RFP se asocia en vesículas móviles. La secuencia temporal de vesículas marcadas con ARFA1-RFP en raíces de *M. truncatula* fue realizada a los 7 días post pasaje a placa de Petri. n= núcleo. Barra= 10 μm .

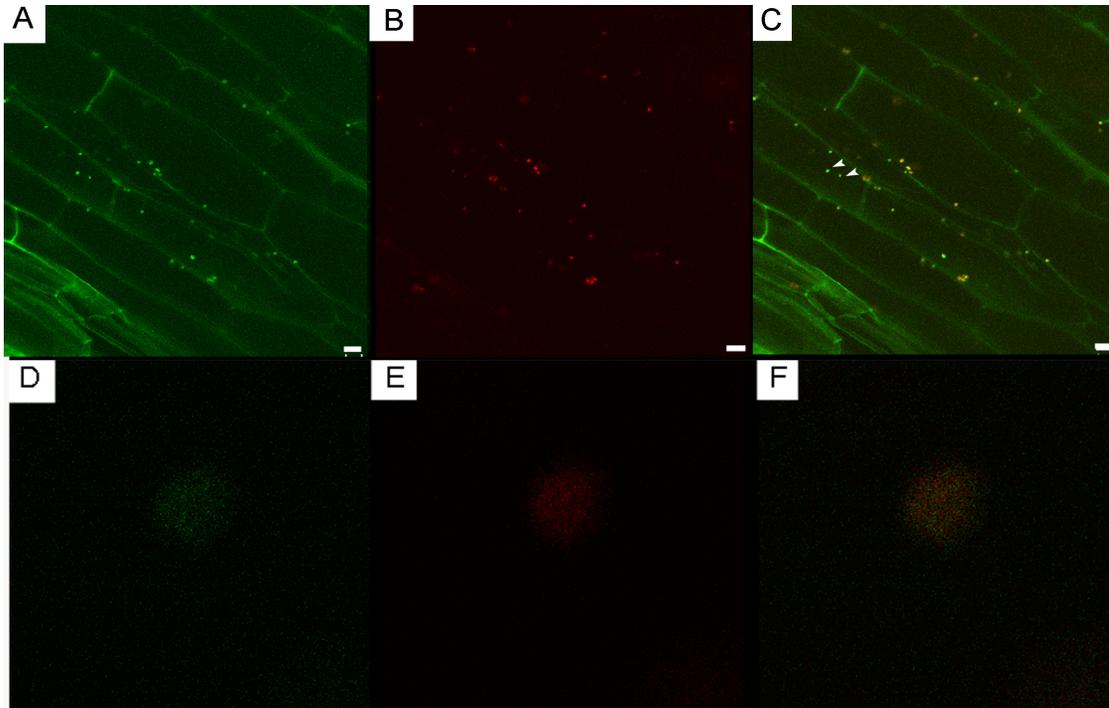


Figura 25. Análisis de colocalización de ARFA1 y RabA2. (A-C) Imágenes de microscopía confocal para el canal verde (GFP-RabA2^{WT}) (A y D), rojo (ARFA1-RFP) (B y E) y la combinación de ambas (C y F). ARFA1-RFP se localiza en estructuras puntuadas con un rango de tamaño entre 2 y 3 μm. Se identificó una subpoblación de vesículas de entre 1-2 μm que sólo presentó marcación con GFP-RabA2^{WT} (indicadas con flechas blancas). Sin embargo, se observó que la mayoría de las estructuras puntuadas presentaron marcación fluorescente correspondiente a ARFA1-RFP y GFP-RabA2^{WT}. Barras A-C= 10 μm. La amplificación de las imágenes permitió analizar en mayor detalle la colocalización de ARFA1-RFP y GFP-RabA2^{WT} (D-F).

Generación de plantas compuestas de *M. truncatula* que expresan *ARFA1*^{WT}, *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N}

Previamente se describió que existe una alta homología entre las secuencias de los miembros de ARFA1 de *A. thaliana*, por lo que los estudios de genética reversa por RNAi o de genética directa mediante el estudio de mutantes no permitieron observar fenotipos, tal vez debido a la redundancia de funciones (Xu and Scheres, 2005). Considerando este antecedente, se propuso generar formas mutantes que afectan la regulación en forma dominante sobre el resto de los miembros de la familia ARFA1 para expresarlas en plantas compuestas y realizar un análisis funcional.

A partir del marco abierto de lectura de *ARFA1e* se generaron mutaciones puntuales en el sitio catalítico mediante la sustitución de una Glutamina en la posición 71 por una Leucina,

(Q71L, forma incapaz de hidrolizar el GTP) o la sustitución de una Treonina en la posición 31 por una Asparragina (T31N, forma unida a GDP) por mutagénesis dirigida para generar las formas *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N}. Las secuencias generadas fueron clonadas en el vector de destino pK7WG2D mediante el sistema GATEWAY para obtener una expresión controlada por el promotor 35S (Karimi et al., 2007). Estos clonados fueron realizados en nuestro laboratorio por la Lic. Virginia Savy en el contexto de su tesis de grado. Las construcciones p35S: *ARFA1*^{WT}, p35S: *ARFA1*^{Q71L}, p35S: *ARFA1*^{T31N} y el plásmido pK7WG2D vacío fueron utilizados para la transformación de *M. truncatula* mediante *A. rhizogenes* y las plantas compuestas generadas fueron denominadas pK7WG2D, *ARFA1*^{WT}, *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N}. En primer lugar se analizó el posible efecto de la expresión de las formas mutantes de *ARFA1* sobre la parte área (no transgénica) de las plantas compuestas. No se observaron diferencias en la longitud del tallo y en el número de hojas entre las plantas compuestas que expresan las formas mutantes de *ARFA1* en comparación con las plantas compuestas que fueron transformadas con el vector pK7WG2D (figuras 26 A y B). El vector pK7WG2D contiene el gen *gfp* bajo el control del promotor 35S, por lo que pueden distinguirse las raíces transformadas. De esta forma se determinó que la eficiencia de transformación (definida como el porcentaje de plantas compuestas con al menos una raíz transgénica) del control pK7WG2D y la construcción p35S: *ARFA1*^{WT} fue de 76 % y 69 %, respectivamente. Sin embargo, las construcciones p35S: *ARFA1*^{Q71L} y p35S: *ARFA1*^{T31N} presentaron una eficiencia de transformación de 29 y 26 %, respectivamente. Además, la longitud de las raíces transgénicas de las plantas compuestas que expresan *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N} tuvieron una reducción del 44 % y 41 %, respectivamente, en comparación con *ARFA1*^{WT} y el control pK7WG2D y (figura 27 A y B). Estos resultados sugieren que la acumulación de las formas mutantes de *ARFA1* podría afectar el crecimiento o desarrollo de la raíz.

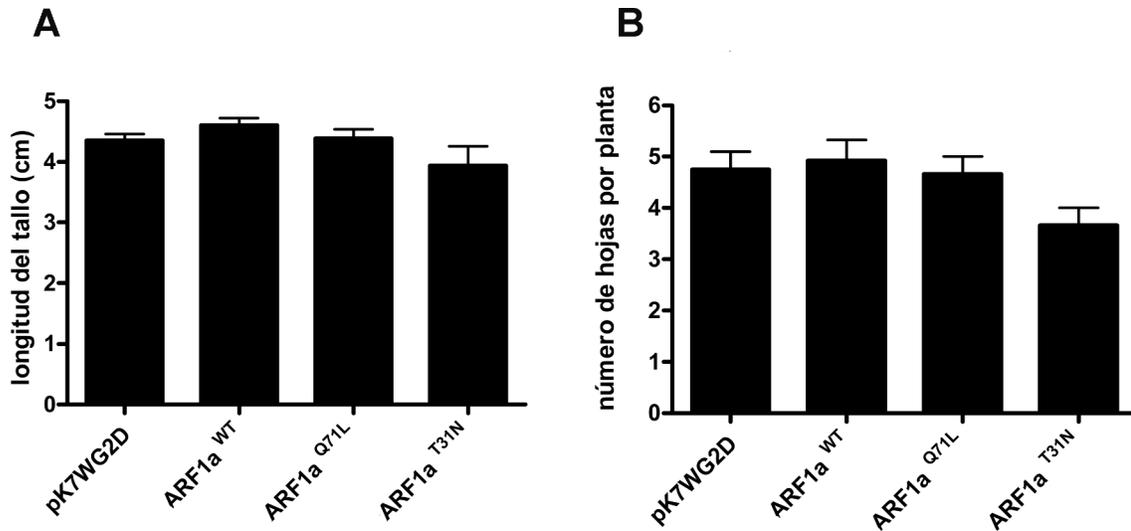


Figura 26. La expresión de las formas mutantes de ARFA1 no afecta el desarrollo de la parte aérea de las plantas compuestas. Se midieron la longitud del tallo (A) y el número de hojas por planta (B). No se observaron diferencias significativas entre las plantas compuestas pK7WG2D, ARFA1^{WT}, ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} de acuerdo al *t-test* de Student con $p \leq 0.05$. Para el análisis se utilizaron al menos 15 plantas por construcción y las barras corresponden al valor promedio y el error estándar (SEM) de dos réplicas biológicas.

La expresión de ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} en raíces de *M. truncatula* afecta eventos de crecimiento polar

Previamente se describió en *A. thaliana* que la expresión tejido específica de las formas mutantes de AtARFA1c en meristema de raíz afectó el desarrollo de raíz, expansión celular y citoquinesis, sin alterar el desarrollo de los pelos radicales (Xu and Scheres, 2005). Estos resultados son consistentes con la baja eficiencia de transformación y la reducción en la longitud de las raíces transgénicas de las plantas compuestas que expresan las formas mutantes de ARFA1. Considerando los antecedentes en *A. thaliana*, el fenotipo detectado en *M. truncatula* podría ser consecuencia de alteraciones en el tráfico de vesículas de procesos celulares requeridos para el crecimiento y desarrollo de la raíz.

Para profundizar el análisis del rol de ARFA1 en el crecimiento de la raíz, se cuantificaron la longitud de las raíces laterales, densidad de raíces laterales, longitud del pelo radical y densidad de pelos. La longitud de las raíces laterales fue similar en las plantas compuestas control y ARFA1^{WT}, ARFA1^{T31N} y pK7WG2D, mientras que la longitud promedio de la raíz lateral en plantas que expresan ARFA1^{Q71L} presentó una reducción del 40 % en comparación

con el control (figura 27 C). En las raíces ARFA1^{WT} se cuantificó una densidad de 1,6 raíces laterales por cm de raíz principal, similar al control pK7WG2D; sin embargo, las raíces ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} tuvieron una reducción en la densidad de raíces laterales del 51 % y 38 %, respectivamente en comparación con el control (figura 27 D).

La longitud de los pelos radicales mostró una reducción del 20 y 27 %, respectivamente, en raíces transgénicas ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} en comparación con el control pK7WG2D, mientras que las raíces de ARFA1^{WT} no presentaron diferencias significativas con el control (figura 27 E). La densidad de pelos radicales (número de pelos radicales por mm de raíz) en raíces transgénicas de ARFA1^{WT} y ARFA1^{Q71L} fue similar al control, mientras que en las plantas compuestas ARFA1^{T31N} se observó una reducción del 35 % en comparación con el control pK7WG2D (figura 27 F).

Todos estos resultados sugieren que la expresión de las formas mutantes de ARFA1 afecta los procesos de crecimiento polar que tienen lugar en la raíz. Sin embargo, la observación por microscopía confocal de las raíces transgénicas de plantas compuestas pK7WG2D, ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} no mostró diferencias evidentes a nivel de arquitectura de la punta de la raíz (figura 28 A-D). Asimismo, el fenotipo de raíz descrito en plantas compuestas que expresan ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} fue menos severo que el fenotipo descrito en las líneas mutantes de ARFA1c de *A. thaliana* (Xu and Scheres, 2005). En conjunto, los resultados indican que la mutación Q71L afectó el crecimiento y formación de raíces laterales, mientras que la T31N, correspondiente a un estado asociado a GDP, tuvo mayor efecto sobre la formación de pelos radicales.

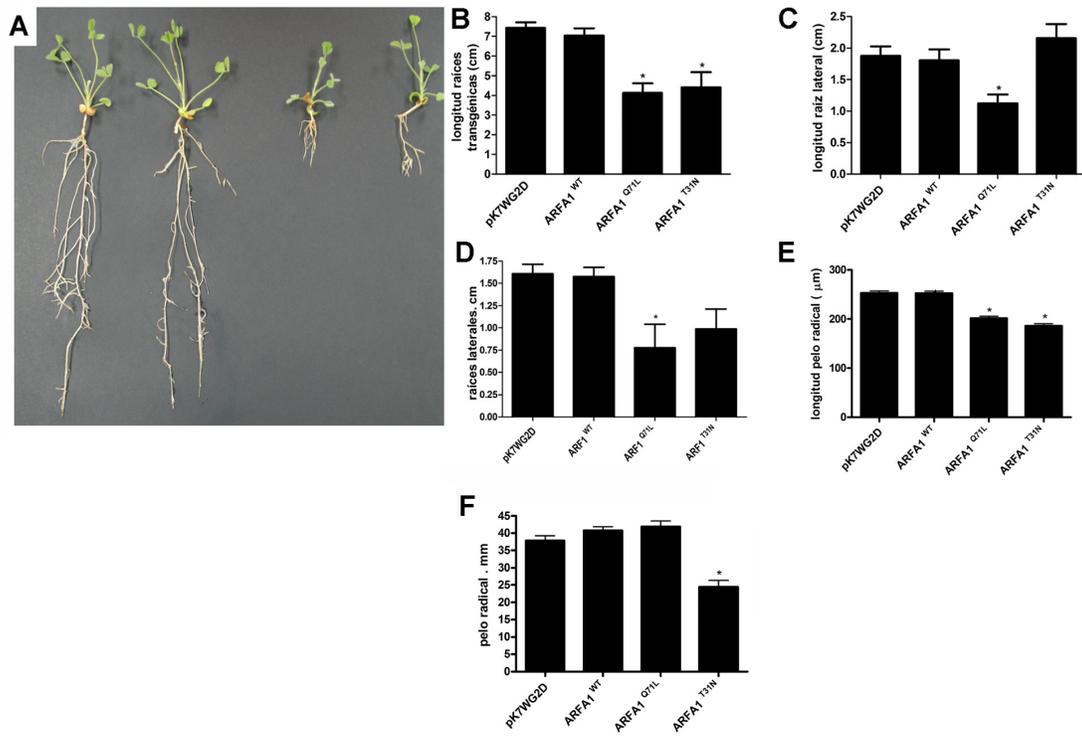


Figura 27. Efecto de las mutaciones en ARFA1 en el fenotipo de raíz. A. Plantas compuestas transformadas con el vector vacío pK7WG2D o que expresan *ARFA1*^{WT}, *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N}. Considerando el fenotipo de raíz observado, se cuantificó la longitud de las raíces transgénicas (B), la longitud (C) y densidad de raíces laterales sobre la raíz principal (D), la longitud (E) y la densidad de los pelos radicales (F) en raíces transgénicas de plantas compuestas pK7WG2D o que expresan *ARFA1*^{WT}, *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N}. Para las mediciones se utilizaron al menos 10 plantas por construcción, y los resultados corresponden a dos réplicas biológicas. Las barras representan el valor promedio y SEM. Los asteriscos indican valores significativos de acuerdo al *t-test* de Student, con $P < 0,05$.

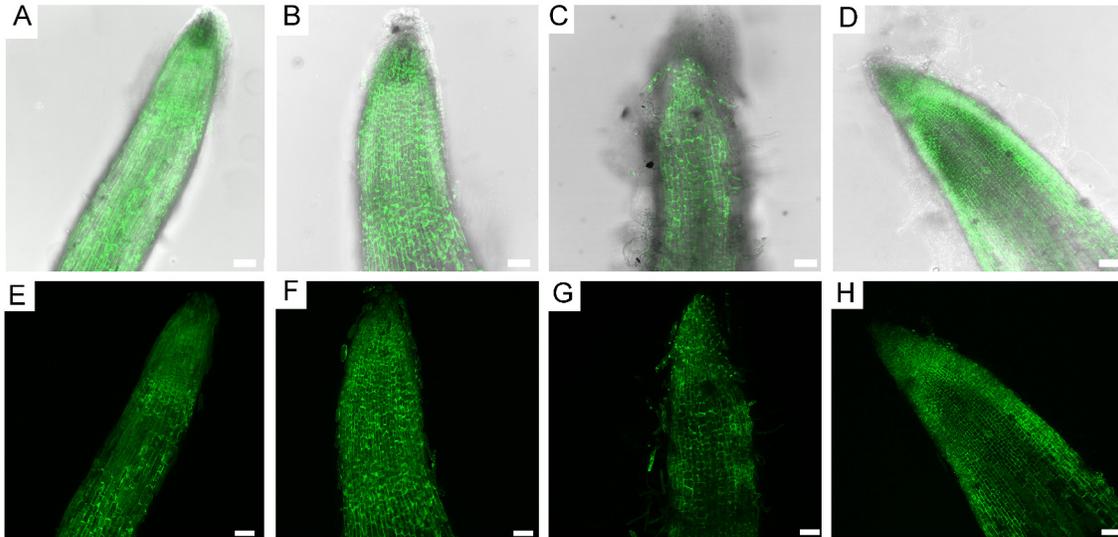


Figura 28. Microscopía confocal de raíces transgénicas de plantas compuestas pK7WG2D (A), ARFA1^{WT} (B), ARFA1^{Q71L} (C) y ARFA1^{T31N} (D). No se observaron diferencias entre las distintas raíces transgénicas a nivel de organización de los tejidos. Las imágenes corresponden a raíces laterales de 10 días luego del pasaje a placas. Las imágenes corresponden a la superposición del visible con GFP (A-D) o GFP (E-H). Barra= 50 μ m.

La expresión de las formas mutantes de ARFA1 en raíz afecta el número de nódulos en *M. truncatula*

Para analizar la posible función de la familia ARFA1 en la nodulación, las plantas compuestas fueron inoculadas con *S. meliloti* y se analizó el número de nódulos formados en el tiempo (figura 29 A). Las raíces transgénicas que expresan ARFA1^{WT} y pK7WG2D presentaron un número similar de nódulos por raíz en los distintos tiempos analizados. Sin embargo, en el caso de las raíces transgénicas de ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} se produjo una reducción del 61 % y 87 %, respectivamente en el número de nódulos formados a los 21 DPI respecto del control pK7WG2D. La observación de los nódulos (figura 29 B-E) no mostró diferencias morfológicas evidentes entre las plantas compuestas ARFA1^{Q71L}, ARFA1^{T31N}, ARFA1^{WT} y pK7WG2D. Tampoco se observaron diferencias cuando se visualizó la estructura de los nódulos mediante microscopía confocal de fluorescencia (figura 29 F-H). En conjunto, estos resultados indican que la expresión de ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} afectan la formación de nódulos, aunque estos resultados están fuertemente relacionados con su efecto sobre el crecimiento de las raíces y pelos radicales.

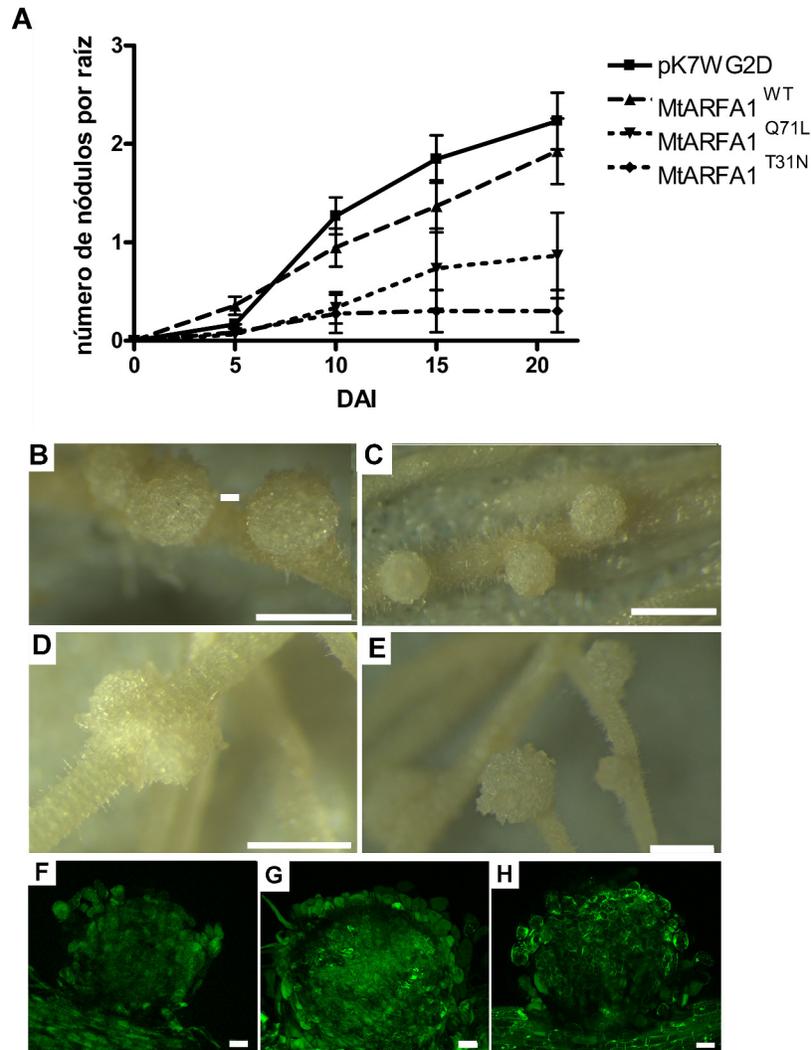


Figura 29. Fenotipo de nodulación en plantas compuestas que expresan ARFA1^{WT}, ARFA1^{Q71L}, ARFA1^{T31N} y el control pK7WG2D en *M. truncatula*. (A) Se cuantificó el número de nódulos por raíz a los 5, 10, 15 y 20 DPI. Solamente se consideraron los nódulos formados sobre las raíces transgénicas, que fueron identificadas por la fluorescencia de GFP. Se utilizó un mínimo de 12 raíces independientes provenientes de 7 plantas por cada construcción analizada. Los nódulos desarrollados en raíces de pK7WG2D (B), ARFA1^{WT} (C), ARFA1^{Q71L} (D) y ARFA1^{T31N} (E) no presentaron diferencias morfológicas visibles. Las imágenes fueron capturadas con lupa a los 10 DPI. Los nódulos de plantas compuestas que expresan ARFA1^{T31N} (F), ARFA1^{WT} (G) o transformadas con pK7WG2D (H) fueron analizados por microscopía confocal a los 15 DPI. Las barras de error en (A) representan el SEM de dos réplicas biológicas. Barras B-E= 1mm, F-G=50 μ m.

DISCUSIÓN CAPÍTULOS I Y II

RabA2 y ARFA1 están implicadas en eventos de crecimiento polar

Como se mencionó previamente, los estudios de crecimiento polar en el tubo polínico y en pelos radicales contribuyeron a dilucidar los mecanismos del crecimiento polar en plantas. En estos modelos, las células se expanden por la construcción de nueva pared celular, membrana plasmática, cambios en el citoesqueleto, la migración del núcleo, cambios en microdominios de membrana y la fusión de vesículas con componentes de señalización. El movimiento de vesículas requerido para sostener este proceso se encuentra regulado por GTPasas monoméricas (Hepler et al., 2001; Cole and Fowler, 2006; Samaj et al., 2006). En el presente trabajo se utilizaron las versiones mutantes RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N}, ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} para profundizar el análisis funcional de las GTPasas monoméricas en eventos de crecimiento polar y en la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios. Las alteraciones en el sitio catalítico de las GTPasas interfieren con la actividad endógena de la proteína y con su localización. Se ha propuesto que las versiones incapaces de intercambiar GDP por GTP secuestrarían la correspondiente proteína reguladora GEF (*Guanine exchange factor protein*), por lo que actuarían en un modo dominante negativo sobre la actividad endógena de la GTPasa. Las versiones incapaces de hidrolizar GTP también producen un efecto negativo sobre la formación y transporte de vesículas, ya que la hidrólisis del GTP es requerida para la inactivación de las GTPasas y posterior activación de otras proteínas regulatorias (East and Kahn, 2011). El análisis del fenotipo en pelo radical permitió determinar que la expresión de las formas mutantes de *RabA2* afectó la longitud de los pelos radicales y el porcentaje de pelos deformados en respuesta al rizobio. Este fenotipo fue más moderado que el observado en raíces transgénicas silenciadas por RNAi *RabA2* (Blanco et al., 2009), lo que sugiere que el silenciamiento por RNAi podría estar afectando la expresión de otros genes de la familia RabA, o que existe una dominancia parcial sobre las formas endógenas en raíces de plantas compuestas de *P. vulgaris* que expresan las formas mutantes *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N}.

En el contexto del estudio de las GTPasas y su función en el crecimiento polar en raíz, se ha reportado que la expresión de las formas mutantes de *ARFA1c* con promotores inducibles afectó el desarrollo de raíz, la expansión celular y la citoquinesis, sugiriendo que esta GTPasa estaría involucrada en diversos procesos celulares (Xu and Scheres, 2005). En el presente trabajo logramos identificar mediante un análisis *in silico* que el gen *ARFA1a* es coexpresado con *RabA2* en *M. truncatula* y mostramos que la expresión constitutiva de las versiones mutantes de *ARFA1* redujo el porcentaje de plantas compuestas con raíces transgénicas. Esto es consistente con los resultados reportados en *A. thaliana* y con la función reguladora que

cumplen las GTPasas en el tráfico de membrana. Sin embargo, algunas plantas compuestas transformadas con las versiones mutantes ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} generaron raíces transgénicas, mostrando un fenotipo menos severo que el descrito en *A. thaliana*. Considerando que cada una de las raíces transgénicas es un evento de transformación independiente, los resultados pueden explicarse por los diferentes niveles de expresión alcanzados en cada raíz. En los eventos de transformación donde se producen mayores niveles de expresión del transgén, ocurrirían alteraciones que impiden el crecimiento de la raíz. Nuestros resultados sugieren que las pocas raíces transgénicas desarrolladas tendrían menores niveles de expresión de las formas mutantes de ARFA1, y como consecuencia, los eventos de crecimiento polar estarían menos afectados. Para poner a prueba esta hipótesis, es necesario expresar las formas mutantes de ARFA1 bajo el control de promotores inducibles. En conjunto, en el presente trabajo se corroboró que las GTPasas RabA2 y ARFA1 están implicadas en eventos de crecimiento polar en leguminosas.

RabA2 participa en la formación del IT

El proceso de formación del IT y posterior progresión intracelular durante la infección por rizobio es un proceso sofisticado que ha sido analizado durante muchos años a través de observaciones por microscopía (Gage, 2004). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados no se encuentran completamente caracterizados. El modelo sugerido de progresión del IT propone que el transporte de vesículas y las GTPasas monoméricas cumplen una función clave para el crecimiento de esta estructura tubular y presenta similitudes con el crecimiento polar observado en el tubo polínico y en el pelo radical (Oldroyd et al., 2011). Por tanto, uno de los objetivos fue estudiar la función de RabA2 en la formación del IT durante la infección por *R. etli*. La expresión de las formas mutantes de *RabA2* produjo defectos en la progresión o elongación de los ITs; sin embargo, el número total de eventos de infección iniciados en los pelos radicales no se encontró afectado. Estos resultados sugieren que RabA2 tendría una función asociada al transporte de membrana requerida para la elongación del IT. Como se mencionó previamente, existen evidencias que relacionan las Rab GTPasas y el crecimiento polar como el que tiene lugar en el tubo polínico y en el IT. Previamente, en *N. tabacum* se demostró que un miembro de la familia RabA (llamada Rab11 por su homología con Rab de animales) regula el crecimiento del tubo polínico, y ambas formas mutantes Q73L y S28N inhibieron el crecimiento *in vitro*. Sin embargo, algunos de los tubos polínicos desarrollados en ambas mutantes se caracterizaron

por presentar curvaturas y fueron incapaces de alcanzar el micrópilo (de Graaf et al., 2005). Otro componente celular esencial para el crecimiento del IT es el citoesqueleto, como pudo demostrarse en diferentes leguminosas (Cardenas et al., 1998; Yokota et al., 2009; Miyahara et al., 2010). Dos genes, *121F-specific p53 inducible RNA (Pir1)* y *nck-associated protein (Nap1)* participan en la dinámica de la formación de filamentos de actina y la formación del IT en *L. japonicus*. La mutación en estos genes produjo defectos en el proceso de infección, resultando en ITs abortivos con estructuras engrosadas y en algunos casos se detectó liberación de rizobios en el citoplasma de las células epidérmicas (Yokota et al., 2009). El ortólogo de *Nap1* en *M. truncatula* es requerido para la progresión del IT, para el crecimiento polar del pelo radical y la activación de ARP2/3, un factor que regula la polimerización y ramificación de actina (Miyahara et al., 2010). El citoesqueleto de actina cumple una función fundamental en el transporte de vesículas, ya que permite la asociación de proteínas motoras y es particularmente activo en las regiones de crecimiento polar, como son el ápice del pelo radical o del tubo polínico (Zhang and McCormick, 2010). En el presente trabajo se demostró que la expresión de las formas RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} afectó la integridad del IT, resultando en ITs abortivos con liberación de bacteria en el citoplasma. Estos resultados presentan similitudes con los obtenidos en mutantes *Pir1* y *Nap1*. Previamente se ha descrito una conexión entre GTPasas y el citoesqueleto, en particular se ha descrito que las GTPasas ROP están relacionadas con la regulación del reordenamiento del citoesqueleto que tiene lugar en la regulación de la polaridad del transporte de membrana, la señalización en respuesta a estímulos externos (Yang and Fu, 2007) y en la progresión del IT (Ke et al., 2012). Además, se describió que ROP6 de *L. japonicus* interacciona con el receptor del NF NFR5, y que el silenciamiento por RNAi de *LjRop6* afecta el número de ITs asociados a córtex y el número de nódulos desarrollados (Kiirika et al., 2012).

Se han descrito otros componentes asociados al tráfico de vesículas relacionados con los procesos de infección en la simbiosis, entre ellos la proteína denominada *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (SNARE) LjSYP71* asociada a la formación del simbiosoma (Hakoyama et al., 2012). Otro gen implicado en la formación del IT es *VAPYRIN*, que codifica para una proteína de interacción que se asocia con proteínas de membrana denominadas *Vesicle Associated Membrane Proteins (VAMP)* (Lev et al., 2008; Murray et al., 2011). En etapas posteriores de la progresión del IT, se demostró que Rab7 y VAMP72, son necesarios para la formación del simbiosoma (Limpens et al., 2009; Ivanov et al., 2012).

La proteína con mayor porcentaje de identidad de secuencia con RabA2 en *A. thaliana* se localiza en el cuerpo de Golgi, el TGN y en la placa celular durante la división celular. Sin embargo, la versión mutante S26N fue localizada en el citosol y en el aparato de Golgi, mientras que la versión mutante Q71L se localizó solamente en el citosol, mostrando que las mutaciones en el sitio catalítico afectan la localización subcelular (Chow et al., 2008). El presente trabajo muestra que RabA2 se localiza alrededor del IT y en los puentes citoplasmáticos que conectan la membrana plasmática con esta estructura tubular, sustentando el rol que cumple esta GTPasa monomérica en mantener la continuidad e integridad del IT.

RabA2 participa en la especificidad de cepa en *P. vulgaris* y ARFA1 está implicada en la nodulación en *M. truncatula*

La organogénesis del nódulo es un proceso complejo y coordinado con el proceso de infección que comienza en la epidermis y depende de un continuo intercambio de señales entre la planta y el rizobio. El NF cumple un papel fundamental en regular ambos procesos y determina la especificidad de la interacción. Además del NF, la presencia de otras moléculas como LPS y EPS es necesaria para una correcta infección de las células corticales. La discriminación entre diferentes especies de rizobios comienza a establecerse en la rizósfera (Simms and Taylor, 2002), donde la planta tiene un rol activo en seleccionar y establecer simbiosis más eficientes que han sido favorecidas por coevolución (Aguilar et al., 2004; Zanetti et al., 2010). En base a los resultados obtenidos en el laboratorio (Peltzer Meschini et al., 2008), se propuso un modelo que permite relacionar el dialogo molecular establecido en etapas tempranas con la capacidad de la planta de seleccionar bacterias más eficientes y mejores competidoras. En este modelo en la variedad Mesoamericana de *P. vulgaris*, RabA2 es requerido para la inducción de *NF-YC1* (cuando se inocula con cepas de *R. etli* que predominan en la misma región geográfica (genotipo *nodC-α*) (Zanetti et al., 2010). En mamíferos, los factores de transcripción NF-Y regulan genes implicados en el control del ciclo celular, como son los genes participan en la transición de las fases G2/M, por ejemplo *cdc2*, *cdc25* y *cyclinB* (Caretta et al., 2003) . En leguminosas se ha demostrado que estos genes del ciclo celular son activados por NF-YC1 en etapas tempranas de la simbiosis y son requeridos para la inducción de las divisiones corticales (Savouré et al., 1994; Zanetti et al., 2010). En contraste, las cepas de *R. etli* que predominan en la región Andina (genotipo *nodC-δ*) no inducen en estos cultivares Mesoamericanos altos niveles de expresión de RabA2 -y por

ende de NFYC1- en etapas tempranas de la interacción. Como consecuencia, la infección por estas cepas de *R. etli* y la posterior formación del primordio de nódulo se encuentran retrasados, resultando en interacciones menos competitivas. Considerando que la nodulación puede ser autoregulada, las cepas que inician rápidamente la infección y organogénesis del nódulo son más competitivas debido a que aceleran el proceso de infección y ocupancia del nódulo (figura 30) (Oka-Kira et al., 2005). En el presente trabajo se mostró que la expresión de las formas mutantes de RabA2 afectó el número de nódulos y la maduración a nódulos fijadores cuando se inoculó con la cepa de *R. etli* SC15, dando sustento a la hipótesis de que esta GTPasa cumpliría un rol en la respuesta de la planta en las interacciones simbióticas más eficientes (Dalla Via et al., 2013).

Considerando que el nitrógeno es una de las mayores limitaciones para el crecimiento de la planta, la optimización de la compatibilidad entre leguminosas y rizobios es necesaria para mejorar la productividad de los cultivos. El modelo propuesto permite explicar algunos componentes de las bases moleculares de la compatibilidad funcional en interacciones simbióticas. El conocimiento de estos mecanismos será clave para desarrollar estrategias que permitan mejorar la capacidad de la planta de seleccionar cepas más eficientes en detrimento de cepas menos eficientes en la fijación de nitrógeno, pero que son buenos competidores en el proceso de ocupación de nódulo.

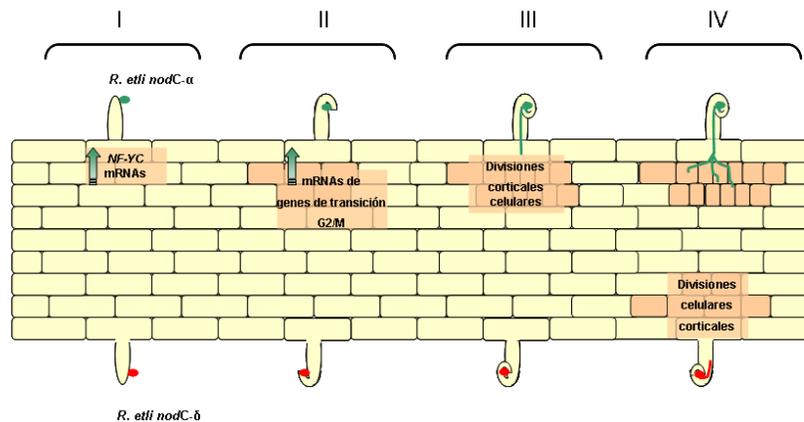


Figura 30. Modelo de organogénesis del nódulo y competencia en la interacción simbiótica *P. vulgaris*- *R. etli*. La asociación más eficiente entre el cultivar Mesoamericano y la cepa de *R. etli* portadora del alelo *nodC-α* es representada en la sección superior de la raíz, mientras que la interacción menos eficiente establecida por la cepa de *R. etli* portadora del alelo *nodC-δ* está representada en la sección inferior. La inducción de NF-YC1 por cepas de *R. etli* con el alelo *nodC-α* activa la expresión de genes del ciclo celular (Estadio II), y como consecuencia la activación de divisiones corticales (estadio III). La infección establecida por cepas de *R. etli*

nodC-α alcanza el primordio de nódulo (estadio IV) más rápidamente que las cepas *nodC-δ* (incapaces de inducir *NF-YCI*). La efectividad en la infección resulta en una ventaja competitiva cuando las dos cepas están presentes en el suelo.

Además de los defectos en el proceso de infección, el análisis por microscopía electrónica de los nódulos inmaduros de las raíces de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} permitió observar eventos de senescencia temprana, como son la ruptura de la membrana del simbiosoma y la presencia de bacteria libre en el citoplasma de las células corticales. La desintegración de los simbiosomas podría explicarse como un efecto secundario generado por alteraciones en el proceso de infección en las mutantes de RabA2, ya que los nódulos que no fijan nitrógeno pueden ser inactivados a partir de una reducción del flujo de oxígeno por parte de la planta (Kiers et al., 2003). Este resultado es similar al fenotipo detectado en nódulos inmaduros de *M. truncatula* producido por el silenciamiento de la GTPasa monomérica Rab7, donde se mostró que Rab7 es requerida para la maduración del simbiosoma (Limpens et al., 2009).

La progresión de bacterias dentro del IT implica una división monoclonal, y en raíces de *P. vulgaris* la expresión de una de las formas mutantes de RabA2 produjo un incremento en el porcentaje de nódulos coocupados con más de una cepa bacteriana, sugiriendo que los defectos en la formación del IT podrían permitir la penetración de múltiples bacterias a través de un mismo IT. Alternativamente, el aumento de los nódulos coocupados puede explicarse por la formación de múltiples eventos de infección en un mismo pelo radical. Estas hipótesis pueden contrastarse utilizando cepas bacterianas marcadas con distintos fluoróforos.

En el contexto del estudio de los eventos moleculares asociados con la simbiosis, la identificación de genes que participan en el proceso de infección ha ganado una enorme importancia. *ARFA1* se identificó como un gen coexpresado con *RabA2* en *M. truncatula* y previamente se demostró su función en el tráfico de vesículas y eventos de crecimiento polar. Sin embargo, no se ha establecido hasta el momento una conexión entre proteínas ARF y la simbiosis. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso estudiar la función de *ARFA1* en la nodulación en *M. truncatula*. El análisis de expresión *in silico* con datos de microarreglos y de secuenciación masiva realizados a partir de cDNA de tejido de raíz de *M. truncatula* mostró que no habría diferencias en los niveles de expresión de los distintos miembros de *ARFA1* en respuesta al rizobio. Sin embargo, mediante un análisis de RT-qPCR (Virginia Savy y Flavio Blanco, resultados no publicados) se determinó que los 5 miembros de *ARFA1* en *M. truncatula* presentan una mayor expresión en la zona I de la raíz correspondiente a la zona meristemática, en comparación con la zona II, que corresponde a la

zona de crecimiento de pelos radicales (zona susceptible). Luego de la inoculación, se observó un incremento en la expresión en la zona susceptible, concomitantemente con una disminución del nivel de transcritos en la zona I para todos los miembros de la familia ARFA1. La expresión en la zona III (pelos elongados) no se modificó significativamente en ninguno de los casos. Estos resultados sugieren que la acumulación de transcritos de *ARFA1* puede ser regulada a nivel local, específicamente en la zona donde se produce la infección.

En este trabajo presentamos evidencias de que la expresión de las formas mutantes ARFA1^{Q71L} y ARFA1^{T31N} en raíces de *M. truncatula* afectó el número de nódulos desarrollados. Sin embargo, para poder establecer una relación entre la reducción del número de nódulos y alteraciones en el proceso de infección, se requerirá un análisis del fenotipo de los ITs. Además, teniendo en cuenta la penetrancia del fenotipo descrito en raíz, para poder definir la función de ARFA1 en la nodulación sería fundamental la utilización de promotores inducibles que permitan evaluar el efecto de la expresión de las versiones mutantes antes y después de la inoculación con el rizobio.

ARFA1 colocaliza con RabA2 en estructuras puntuadas en células corticales de raíz de *M. truncatula*

Las GTPasas de la familia ARF se localizan en membranas donde ocurre la formación de vesículas (Kawasaki et al., 2005) como son el retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi, trans Golgi (TGN), organelas endocíticas y la membrana plasmática (Xu and Scheres, 2005). Estudios genéticos permitieron establecer que son cruciales para el ensamblaje de proteínas de cubierta durante la formación de vesículas (Nie et al., 2003). Sin embargo, el tráfico de vesículas requiere de diversas GTPasas monoméricas, y se han publicado análisis estructurales que demuestran algunas interacciones comunes entre proteínas Arf y Rab, como las interacciones descritas con el efector Arfophilin-FIP3, Arfophilin-FIP4 y el complejo *GGA-Rabaptin-5* (Hickson et al., 2003; Mattera et al., 2003). Además, en *Arabidopsis* se demostró que ARFA1c colocaliza en organelas endocíticas con la Rab GTPasa ARA7 (Xu and Scheres, 2005) y mediante un ensayo de expresión transiente realizado en células de cebolla, se reportó que ARFA1b/1c-eGFP co localiza con RFP-ARA7A. La localización de ARFA1 ha sido materia de debate en los últimos años. Un estudio realizado en cebada (*Hordeum vulgare*) mostró que ARFA1b/c cumple un rol importante en la deposición de callosa en la pared celular durante la respuesta de defensa contra un tipo de hongo patógeno y en base a los resultados de un ensayo de expresión transitoria en células de cebolla se sugirió

que ARFA1b/c-GFP se localiza en cuerpos multivesiculares (MVBs) (Böhlenius et al., 2010). Posteriormente, se publicó una carta al editor cuestionando la localización en MVBs y aportando evidencias de la localización de proteínas ARF en RE, Golgi y TGN (Robinson et al., 2011). Los autores argumentaron que la localización en los MVBs puede ser un artificio producido por la sobreexpresión dirigida por un promotor fuerte o por la presencia de las proteínas fluorescentes en las fusiones traduccionales. En el presente trabajo se demostró mediante ensayos de cotransformación en raíces de *M. truncatula* que RabA2 colocaliza parcialmente con ARFA1 en estructuras puntuadas móviles con un rango de tamaño de 2-3 μm . La localización y tamaño de las estructuras puntuadas marcadas por ARFA1 y RabA2 es similar a las organelas endocíticas con marcación de ARA7 y ARFA1 reportadas en *A. thaliana* (Xu and Scheres, 2005). Sin embargo, para confirmar la colocalización, será necesario realizar un análisis de inmunolocalización (inmunogold o inmunofluorescencia) con anticuerpos específicos.

Conclusiones finales

En el presente trabajo mostramos que la expresión de versiones mutantes de RabA2 y ARFA1 en raíz interfirió en su localización subcelular y afectó el tráfico de vesículas entre membranas. Esto remarca la importancia del tráfico de vesículas en eventos de crecimiento polar que tienen lugar en la simbiosis. En particular, los resultados obtenidos en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresan variantes mutantes de RabA2 sugieren que la maquinaria molecular implicada en el crecimiento polar durante la infección por el IT es la misma que participa en otros procesos de crecimiento polares, como el que tiene lugar en el pelo radical y en el crecimiento del tubo polínico. Los resultados obtenidos para esta GTPasa monomérica en *P. vulgaris* proveen evidencias esta proteína está implicada en mecanismos moleculares que determinan la preferencia de cepas más eficientes durante la formación del IT. El conocimiento de estos procesos es clave para la manipulación genética en leguminosas que genere plantas capaces de discriminar y seleccionar las cepas de rizobios más eficientes.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del transcriptoma de *P. vulgaris*: regulación transcripcional modulada por moléculas de EPS, LPS y NF de *R. etli*

Capítulo III. Análisis del transcriptoma de *P. vulgaris*: regulación transcripcional modulada por moléculas de EPS, LPS y NF de *R. etli*

Diseño experimental

Como se mencionó previamente, la percepción del lipoquitooligosacárido denominado NF es requerida para la infección y organogénesis del nódulo (Oldroyd et al., 2011). Los procesos de infección regulados por NF incluyen la deformación del pelo radical, la degradación local de la pared celular, y posterior formación del IT. Sin embargo, la bacteria posee otros componentes involucrados en el reconocimiento y señalización asociados a la infección, como los exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y glucanos cíclicos (Giraud, 2007; Jones et al., 2007b; Downie, 2010). La evidencia de la importancia de los LPS y EPS en la interacción con la planta proviene de estudios con cepas mutantes en algunas de las enzimas requeridas para su síntesis, aunque hasta el momento no se ha establecido claramente cuáles son las funciones que cumplen en la compleja red de señalización que se establece en la simbiosis (Downie, 2010). Se ha descrito previamente que la cepa de *R. etli* CE109, mutante en un componente del LPS denominado sacárido I, induce la organogénesis del nódulo, aunque la mutación afecta el proceso de infección y liberación de la bacteria (Noel et al., 1986). La cepa de *R. etli* CE338, mutante en la producción de EPS acídicos, no afectó la nodulación en plantas de poroto (aunque está descrito que son necesarios para la infección en especies que forman nódulos indeterminados) y la cepa de *R. etli* CE343, doble mutante en EPS acídicos y LPS I, desarrolla un fenotipo similar al producido por la cepa de *R. etli* CE109. Los genes *nod*, que incluyen los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* son necesarios para la síntesis de NF. La cepa UBPI02 (derivada de la cepa CE3) tiene mutado el gen *nodA* en el plásmido simbiótico *pSym*, por lo que presenta un fenotipo no nodulante (Nod⁻). En este trabajo esta cepa se denominó NodA⁻.

En el presente trabajo se propuso evaluar los cambios transcripcionales en respuesta a las moléculas de EPS, LPS y NF en etapas tempranas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli* mediante un análisis de transcriptómica utilizando RNASeq (Illumina). Esta metodología permite obtener un perfil del transcriptoma mediante tecnologías de secuenciación masiva. Para cumplir con este objetivo, se utilizaron las cepas mutantes de *R. etli* CE338, CE109, CE343, NodA⁻ y como controles se realizaron inoculaciones con la cepa CE3 y o con medio de cultivo (YEM). CE3 es una cepa con resistencia espontánea a estreptomycin derivada de

la cepa de *R. etli* CFN42. Considerando que las cepas mutantes seleccionadas para este trabajo derivan de esta cepa, la misma fue seleccionada como control de referencia.

Previamente a la recolección de las muestras para la síntesis de cDNA se corroboraron las características fenotípicas relacionadas a la nodulación y fijación de N₂ descritas en la literatura (tabla 4) (Noel et al., 1984; Diebold and Noel, 1989; Vazquez et al., 1991; Eisenschenk et al., 1994).

Tabla 4. Cepas de *R. etli* utilizadas y sus fenotipos

Cepa	características ¹	fenotipo simbiótico ²
CE3	WT	Ndv ⁺ Fix ⁺
UBP102 (NodA ⁻)	NodA ⁻ (NF)	Ndv ⁻ Fix ⁻
CE109	Ops ⁻ (LPS)	Ndv ⁻ Fix ⁻
CE338	Exo ⁻ (EPS)	Ndv ⁺ Fix ⁺
CE343	Ops ⁻ Exo ⁻ (LPS,EPS)	Ndv ⁻ Fix ⁻

¹ WT, cepa salvaje, NodA⁻, incapaz de sintetizar NF; Ops⁻, deficiente en la producción de LPS; Exo⁻, deficiente en la producción de EPS. ² El fenotipo Ndv refiere a la formación normal de nódulos (Ndv⁺) o a su ausencia (Ndv⁻), mientras que Fix corresponde a nódulos rosas fijadores (Fix⁺) o blancos no fijadores (Fix⁻).

Los nódulos desarrollados por las cepas CE3 y CE338 presentaron lenticelas y color rosado, indicando el correcto intercambio gaseoso y la presencia de leghemoglobina, requerida para generar el ambiente microaerobio en el cual funciona la actividad nitrogenasa (figura 31 A y C). Por el contrario, las raíces inoculadas con NodA⁻ y CE109 no desarrollaron nódulos. La mayoría de las raíces inoculadas con CE343 tampoco desarrollaron nódulos, a excepción de una de las plantas inoculadas que desarrolló un nódulo inmaduro (figura 31 B, D y E). Estos resultados confirmaron los fenotipos de nodulación descritos para estas cepas de *R. etli*.



Figura 31. Fenotipos de nodulación. Imágenes de nódulos de 21 DPI con las cepas de *R. etli* CE3 (A), CE109 (B), CE338 (C), CE343 (D) y NodA⁻ (E) desarrollados en raíces de *P. vulgaris* variedad Nag12. Barras = 1 mm.

Obtención de las bibliotecas, secuenciación y análisis de los datos

El material biológico utilizado para el análisis de transcriptómica corresponde a dos réplicas biológicas de tejido de raíz de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con las cepas de *R. etli* CE3, CE338, CE109, CE343 y NodA⁻. En cada ensayo biológico, se inocularon cinco plantas de *P. vulgaris* por cada cepa utilizada y 24 HPI se cosecharon las raíces y se combinaron los tejidos pulverizados de las cinco plantas para una mejor representatividad. Posteriormente se realizó la extracción del RNA total y la síntesis de bibliotecas de cDNA para RNAseq utilizando la tecnología Illumina. La construcción de las bibliotecas de cDNA involucra la purificación de mRNA a partir de RNA total, seguido de una etapa de fragmentación. Los fragmentos son utilizados como molde para la síntesis de cDNA, seguido de una etapa de reparación de extremos, ligación de adaptadores específicos y amplificación por PCR. El esquema utilizado se encuentra representado en la figura 32.

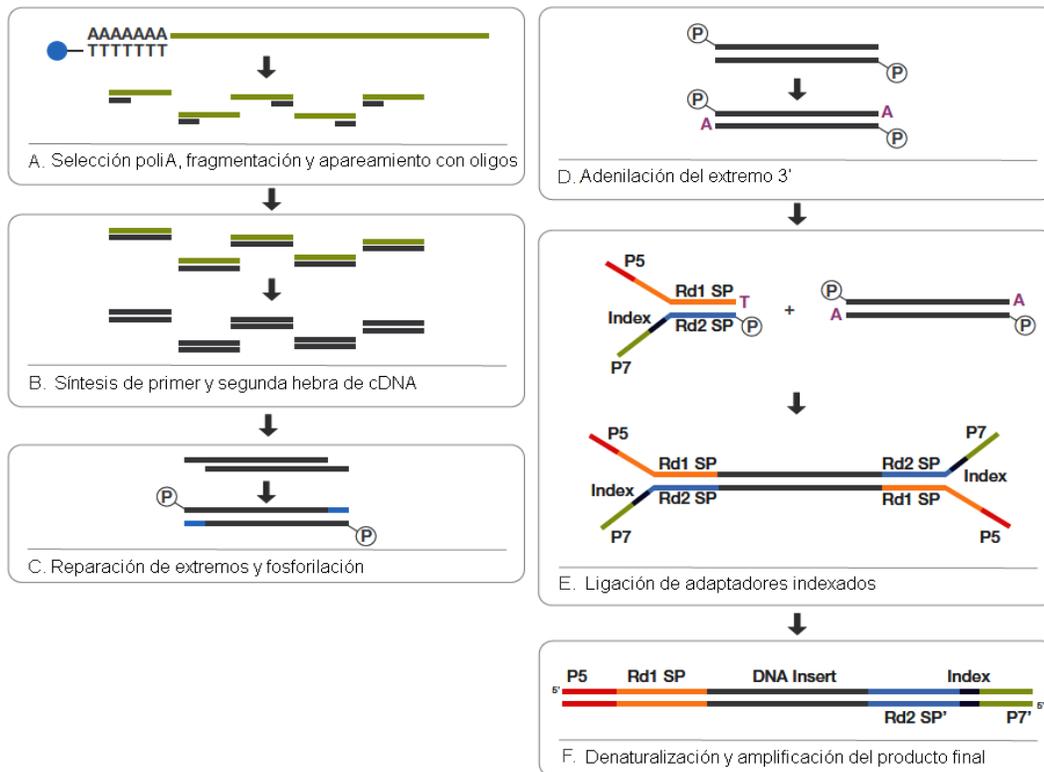


Figura 32. Esquema de la síntesis de cDNA para RNAseq utilizando metodología Illumina. A partir de mRNA purificado se generan fragmentos de aproximadamente 200 pb por tratamiento con cationes divalentes (A). La segunda etapa consiste en la síntesis de la primera y segunda hebra de cDNA (B). Luego los fragmentos son procesados por reparación de extremos (C). Posteriormente los extremos 3' son adenilados y se ligan adaptadores específicos (C y E). El último paso consiste en una amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA (F).

El análisis cualitativo y cuantitativo de las bibliotecas se realizó mediante electroforesis capilar en el equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer* y permitió detectar en todas las muestras un perfil de electroferograma con un pico máximo ubicado en el rango de 200- 300 pb, que corresponde al perfil esperado para las muestras de RNAseq (figura 33). Los valores cuantitativos de los picos máximos de las electroforesis de cada muestra fueron utilizados para la normalización de cada una de las bibliotecas a una misma concentración. Finalmente se *poolearon* las bibliotecas de RNAseq teniendo en cuenta la compatibilidad de los adaptadores y se secuenciaron con el equipo *Illumina HiSeq2500 Analyzer* (Universidad de Riverside, California). Las réplicas biológicas fueron secuenciadas independientemente.

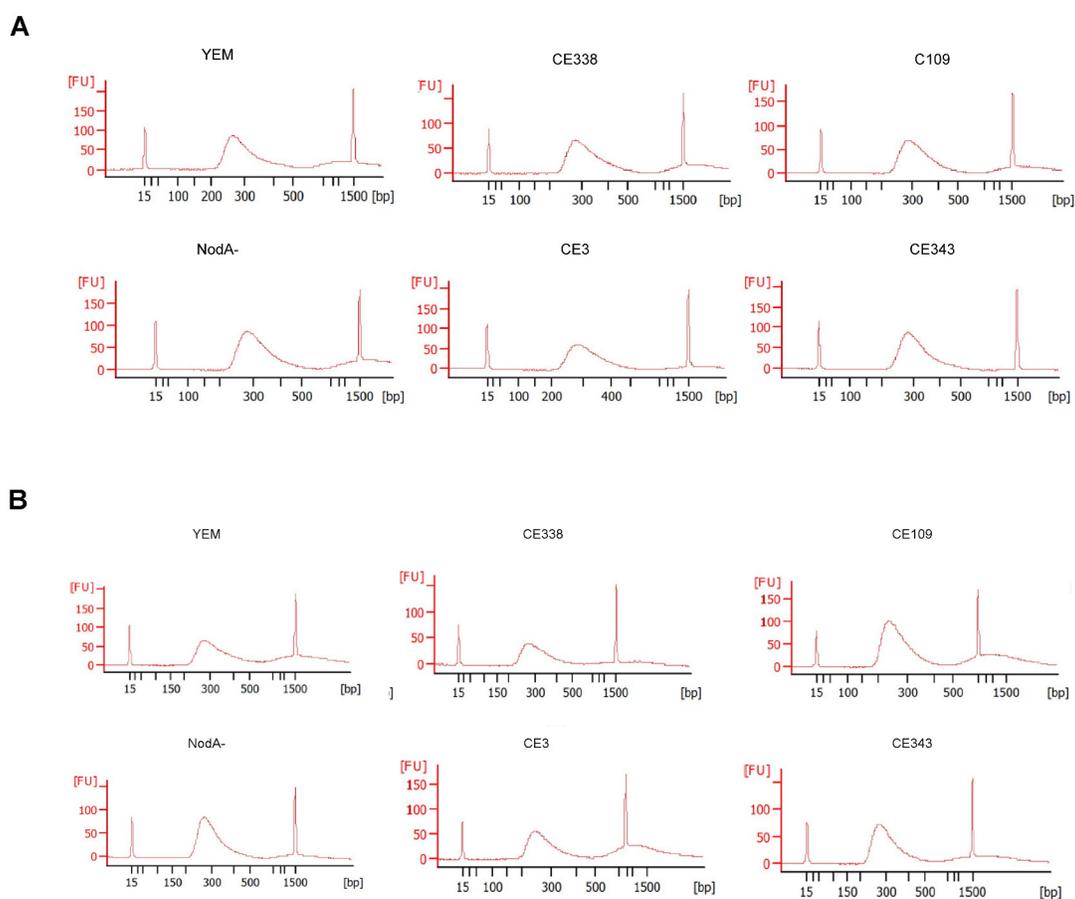


Figura 33. Electroferogramas de las bibliotecas de RNAseq generadas a partir de tejido de raíces de poroto inoculadas con el medio de cultivo (YEM) o con las cepas de *R. etli* CE3, CE109, CE 338, CE343 y NodA-. Electroferogramas correspondientes a la réplica biológica número 1 (A) y 2 (B). En el eje y están representadas las unidades de fluorescencia (FU), mientras que en el eje x se grafica la longitud de los fragmentos en pb.

A partir de cada ronda de secuenciación, se obtuvo un mínimo de 91 millones de lecturas de extremo simple para cada biblioteca, con una longitud de 50 pares de base. Cada base tiene asignado un score de calidad determinado por un algoritmo del tipo *Phred* (Ewing B, 1989a; Ewing B, 1989b). Un alto score de calidad se correlaciona con una baja probabilidad de error y el valor de Q30 indica un score de calidad equivalente a una precisión de 99,9 %. El análisis de calidad permitió demostrar que más del 95% de las bases presentaron un score superior a Q30 y el score promedio no fue inferior a 35 para cada base secuenciada (tabla 5). Estos resultados confirman la calidad de las muestras y la confiabilidad de la secuenciación.

El análisis informático de los datos de RNAseq se realizó a través de la interfase GALAXY (Goecks et al., 2010; Blankenberg and Hillman-Jackson, 2014) aplicando el esquema TUXEDO (figura 34). La primera etapa del análisis requirió el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia (genoma *Phaseolus vulgaris* v1.0, fuente DOE-JGI, USDA-NIFA, ARRA) utilizando el programa *TopHat2* (Kim et al., 2013), que permite el alineamiento de lecturas respecto de transcritos conocidos y la identificación de nuevos sitios de *splicing*. Además, *TopHat2* identifica lecturas en segmentos del genoma donde ocurrieron translocaciones genómicas, permitiendo obtener alineamientos más sensibles y precisos, incluso en genomas altamente repetitivos o con pseudogenes. Con esta herramienta se obtuvo un porcentaje promedio de 87 % de alineamiento con el genoma de referencia (tabla 5).

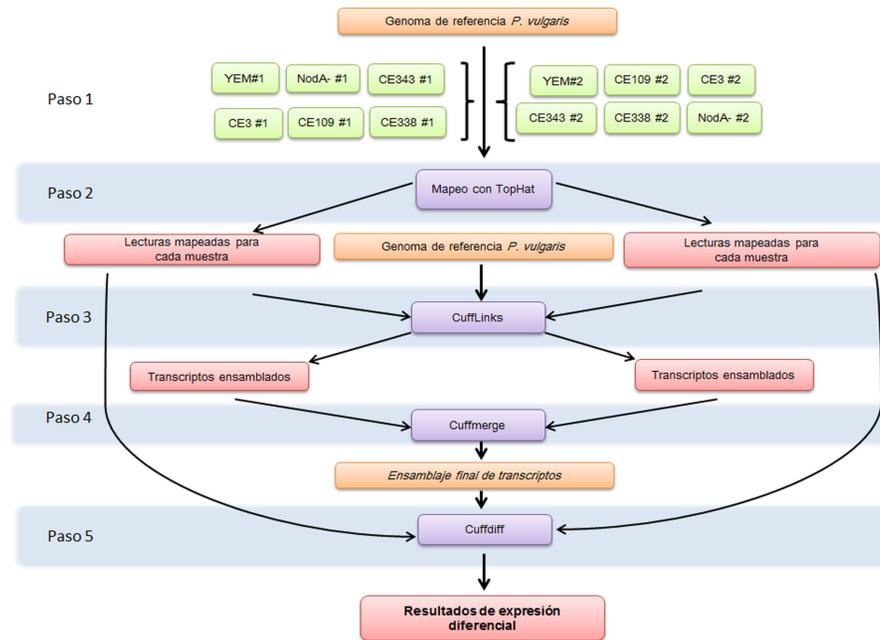


Figura 34. Esquema del análisis bioinformático TUXEDO para el análisis de los datos de RNAseq. El análisis TUXEDO fue realizado a través de GALAXY (<https://usegalaxy.org/>). *TopHat2*, *Cufflinks*, *Cuffmerge* y *Cuffdiff* fueron las herramientas utilizadas para obtener los resultados de expresión diferencial entre las muestras de raíz inoculadas 24 HPI con las cepas de *R. etli* YEM, CE3, CE343, CE338, CE109 y NodA.

Tabla 5. Datos de RNAseq correspondientes a tejido de raíz de *P. vulgaris* 24 HPI con distintas cepas de *R. etli* y el control YEM

Muestras	# de lecturas	% de lecturas alineadas	% de bases \geq Q30	promedio de Score de calidad
YEM #1	48,002,159	94.40%	96,14	37,79
YEM #2	53,721,747	94.50%	96,98	38,15
CE3 #1	106,596,081	92.00%	96,95	38,16
CE3 #2	38,891,775	85.50%	97,59	38,43
NodA- #1	46,605,355	92.20%	97,38	38,34
NodA- #2	45,183,948	80.70%	97,95	38,30
CE 343 #1	67,188,129	91.80%	95,70	37,61
CE 343 #2	23,843,900	89.20%	96,97	38,16
CE 109 #1	59,794,351	91.60%	97,06	38,17
CE 109 #2	49,665,410	87.10%	97,62	38,34
CE 338 #1	96,468,683	92.60%	95,63	37,60
CE 338 #2	45,836,852	85.90%	97,61	38,44

Las lecturas mapeadas en el genoma de referencia obtenidos a partir de *TopHat2* fueron utilizados para ensamblar los transcritos mediante *Cufflinks*. La herramienta *Cufflinks* permite además estimar la abundancia de los transcritos. La unidad utilizada para la estimación de cada transcripto se define como FPKM (del inglés *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*, Fragmentos por Kilobase de transcripto por millón de lecturas alineadas) (Trapnell et al., 2010). Posteriormente, se realizó un análisis con *Cuffdiff* para identificar genes con expresión diferencial. Como resultado se identificaron 304 genes diferencialmente expresados en raíz 24 HPI con las cepas de *R. etli* CE3, CE338, CE109, CE 343 y NodA⁻ y el control YEM (tabla suplementaria 1, Anexo III). Para estimar la dispersión de los datos de RNAseq se utilizó la herramienta *CummeRbund* (Trapnell et al., 2012). Las medidas de dispersión refieren a la variabilidad en la distribución de datos respecto de la media. El análisis, representado mediante *boxplots*, permitió determinar una distribución homogénea de los valores de FPKM en todas las muestras de RNAseq (figura 35). Por otro lado, los diagramas volcano permitieron visualizar la presencia de genes con expresión diferencial y con significancia estadística ($p < 0.05$) en todas las comparaciones realizadas (figura 36).

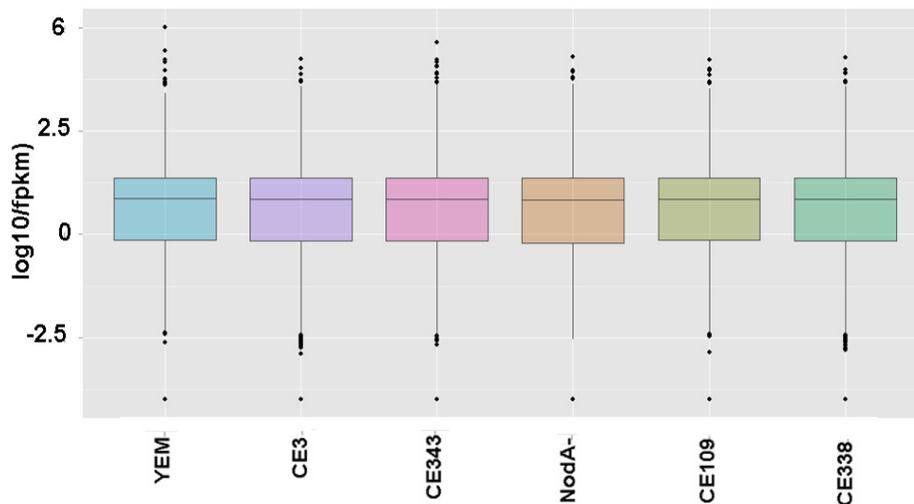


Figura 35. Control de calidad de los datos de RNAseq. A. *Box plots* de las distribuciones de los valores de FPKM en cada muestra. Los análisis fueron realizados con *CummeRbund* en lenguaje R.

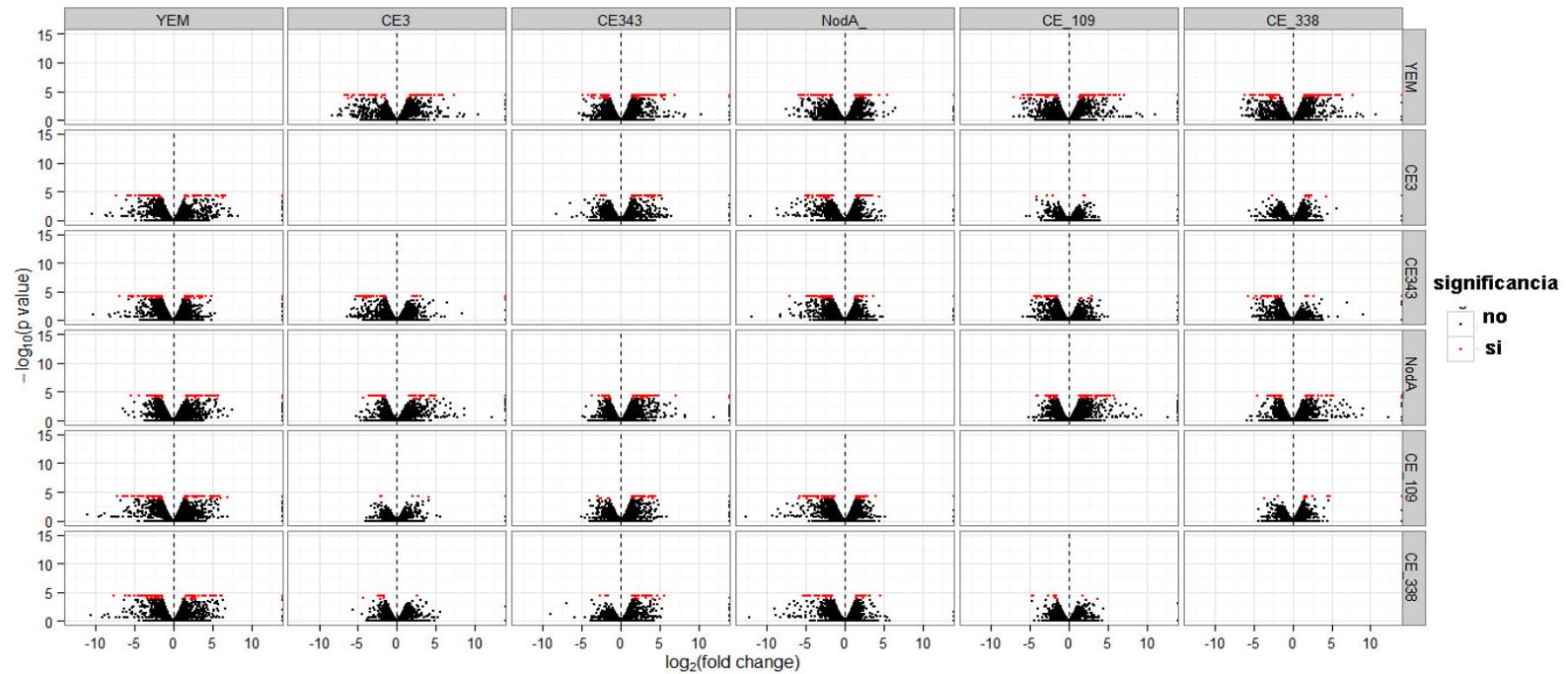


Figura 36. Cambios en el transcriptoma de muestras de raíz inoculadas con las cepas de *R. etli* CE3, YEM, CE109, NodA- y CE343. Cada punto representa un gen. El eje x corresponde al logaritmo en base 2 (\log_2) del cambio del valor absoluto entre las muestras comparadas, mientras que en el eje y se representa el $-\log_{10}$ del valor de probabilidad (p). Los puntos con color rojo refieren a valores con diferencias estadísticamente significativas. Los puntos ubicados en la derecha de cero en el eje x son genes regulados positivamente mientras que los genes a la izquierda de cero corresponden a genes regulados negativamente.

Análisis de la expresión de nodulinas

Los niveles de expresión de nodulinas previamente descritas en la literatura fueron analizadas por RT-qPCR para comparar con los datos de RNAseq y validar los resultados. Los datos de FPKM y de RT-qPCR permitieron detectar la acumulación de transcritos de *ENOD40*, *NIN* y *ERN* en las muestras de RNAseq de raíz 24 HPI con las cepas de *R. etli* CE3, CE343, CE109 y CE338. En contraste, en las muestras YEM y la cepa NodA⁻, los niveles de expresión de estas nodulinas fueron bajos. Estos resultados corroboraron los fenotipos de nodulación descritos para estas cepas y validan los datos de RNAseq (figura 37 A y B).

Clustering de los genes diferenciales regulados por LPS, EPS y NF

A partir de los datos de FPKM de los genes diferencialmente expresados en las muestras de raíz de *P. vulgaris* 24 HPI con YEM, *R. etli* CE3 y CE109, CE338 y NodA⁻, se aplicó el método de cuantificación vectorial *k-means Clustering* para identificar patrones de expresión modulados por EPS, LPS o NF (MacQueen, 1967). Esta metodología consiste en agrupar genes que tienen patrones de expresión similares y dividirlos en un número de *k* grupos. En el análisis realizado en este trabajo, se definió un *k*=6, porque corresponde al valor que empíricamente se ajustó mejor a la clasificación de los datos. Para el análisis se utilizaron distintas combinaciones de datos de RNAseq, YEM/CE3/CE338, YEM/CE3/CE109, YEM/CE3/NodA⁻, y YEM/CE3/CE343 (tablas suplementarias 2, 3, 4 y 5 respectivamente, Anexo III). El perfil de expresión correspondiente a genes inducidos por LPS, EPS y NF o la combinación de EP/LPS fue definido como aquellos genes con mayores niveles de expresión en respuesta la cepa CE3 respecto al control YEM y respecto a las muestras inoculadas con la cepa mutante.

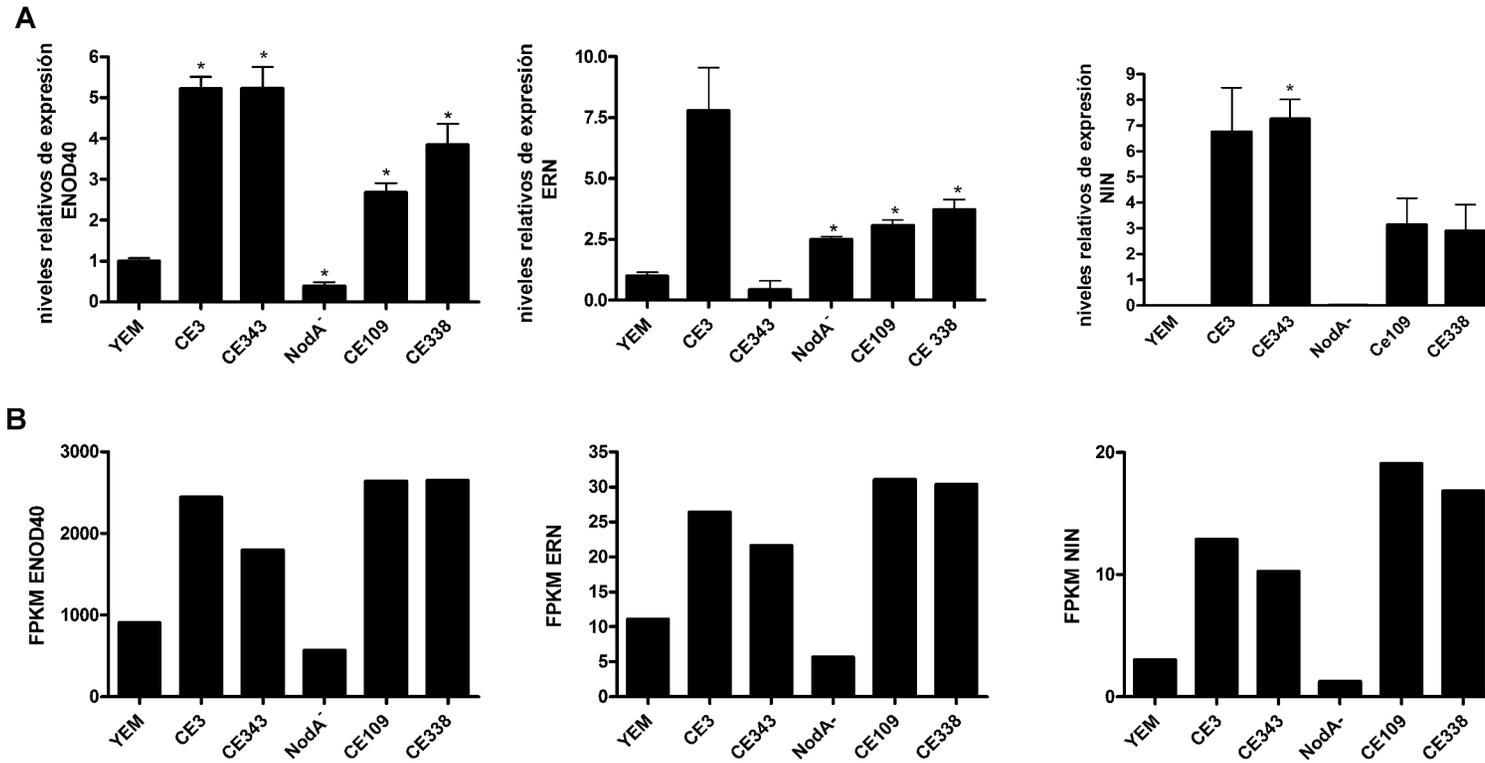
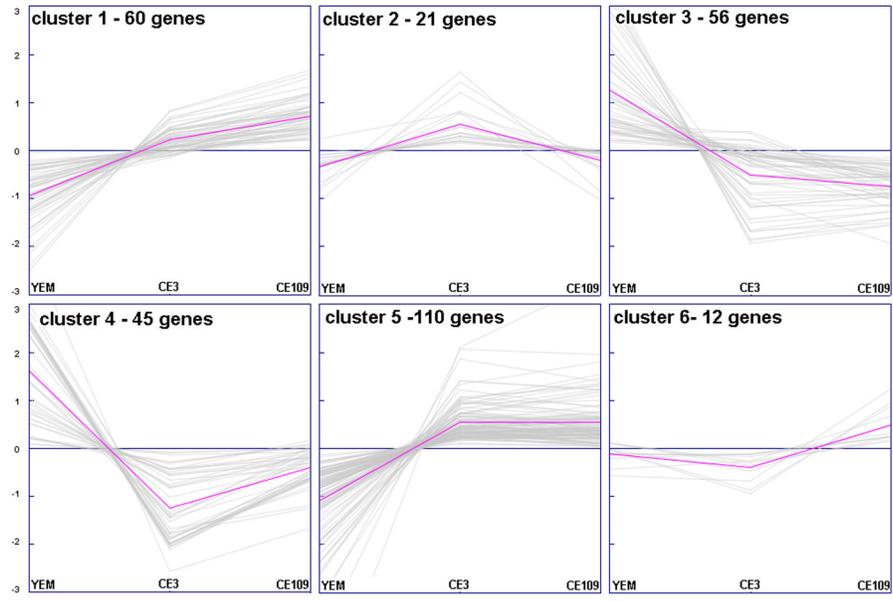


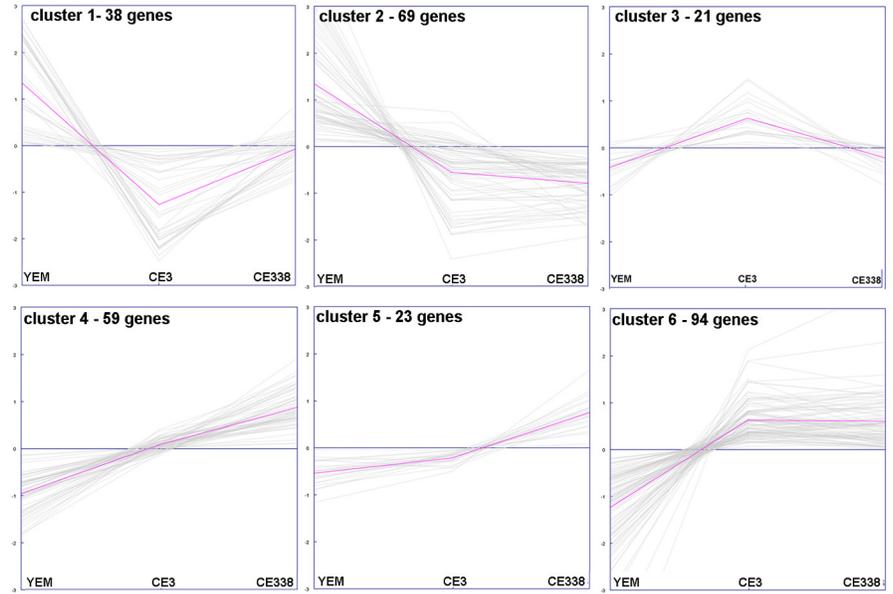
Figura 37. Validación de los datos de RNAseq por análisis de los niveles de expresión de nodulinas. **A.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de *ENOD40*, *ERN* y *NIN*. Las barras representan el valor promedio y SEM. Los asteriscos indican valores significativos de acuerdo al *t-test* de Student, con $P < 0,05$. **B.** Valores de FPKM correspondientes a los transcritos de las nodulinas *ENOD40*, *ERN* y *NIN* obtenidos por RNAseq.

Por otra parte, los genes regulados negativamente por LPS, EPS, NF y la combinación LPS/EPS fueron definidos como aquellos genes con niveles de expresión más altos en las muestras inoculadas con las cepas mutantes respecto de la cepa CE3 (figura 38). La lista de genes de cada *cluster* con sus respectivos indicadores se encuentra disponible en las tablas suplementarias 2-5 en el Anexo III. A partir del análisis de los perfiles de expresión de los distintos *clusters* obtenidos con los datos de RNAseq de las muestras YEM/CE3/CE109, se pudo determinar que el *cluster 2* correspondería a genes inducidos por LPS; mientras que los genes clasificados en los *clusters 1, 4 y 6* presentaron un patrón de expresión reprimido por LPS (figuras 38 A). Por otro lado, el análisis de los perfiles de expresión en las muestras YEM/CE3/CE338 indicó que la lista de genes del *cluster 3* corresponderían a genes inducidos por EPS; mientras que en los *clusters 1, 4 y 5* corresponderían la clasificación de genes reprimidos por EPS (figuras 38 B). Respecto del análisis de *clustering* de la combinación de datos de YEM/CE3/NodA⁻, se identificó que los genes regulados positivamente por NF fueron agrupados en el *cluster 1*, mientras que los genes reprimidos por NF fueron agrupados en los *clusters 2, 3 y 5* (figuras 38 C). Los datos de las muestras YEM/CE3/CE343 indicaron que los genes inducidos por las moléculas de EPS y LPS fueron clasificados en el *cluster 1*, mientras que los genes reprimidos por EPS y LPS se detectaron en los *clusters 2, 4, 5 y 6* (figura 38 D). Los patrones de expresión regulados por LPS, EPS y NF o la combinación LPS/EPS fueron graficados como *heatmaps* utilizando el software GENESIS (figura suplementaria 1 A, B, C y D).

A



B



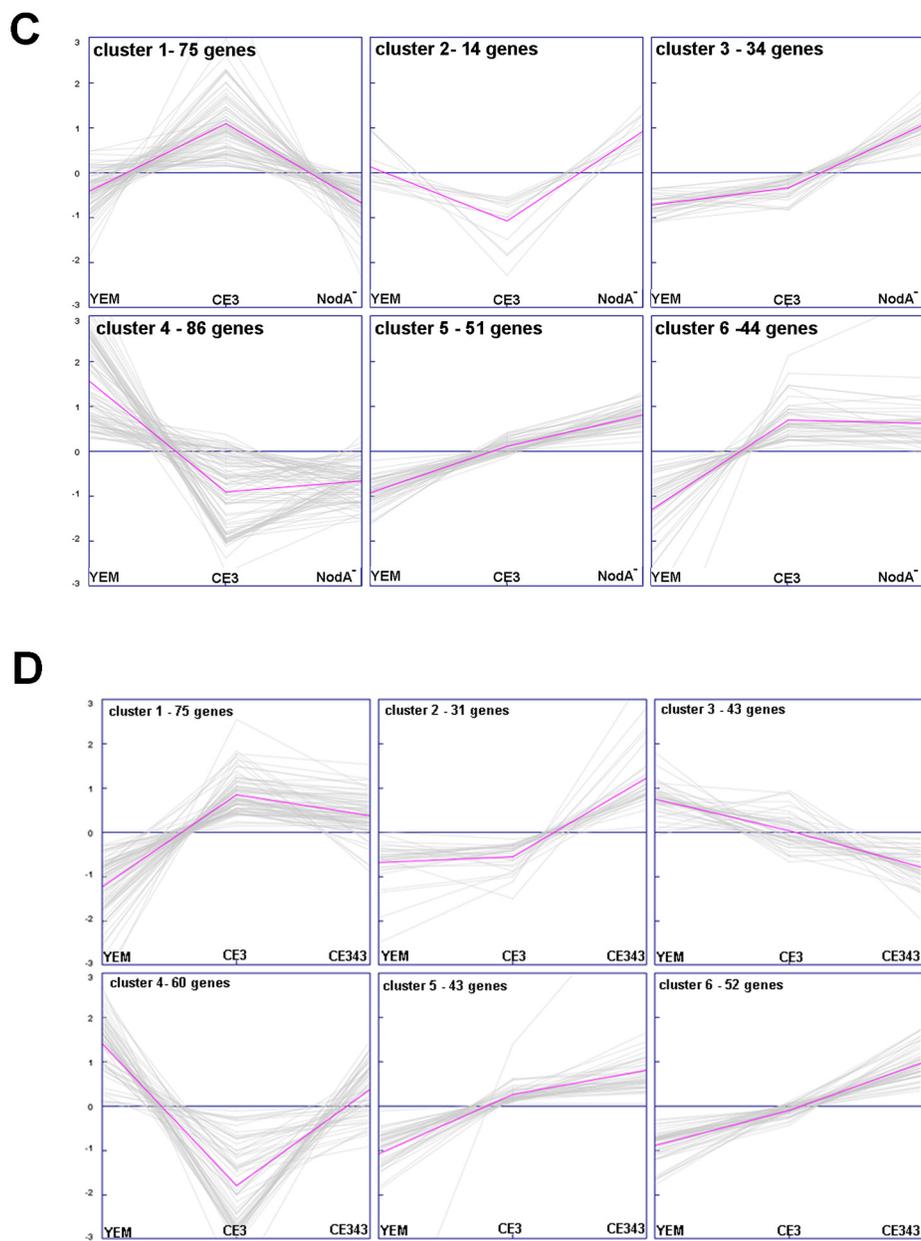
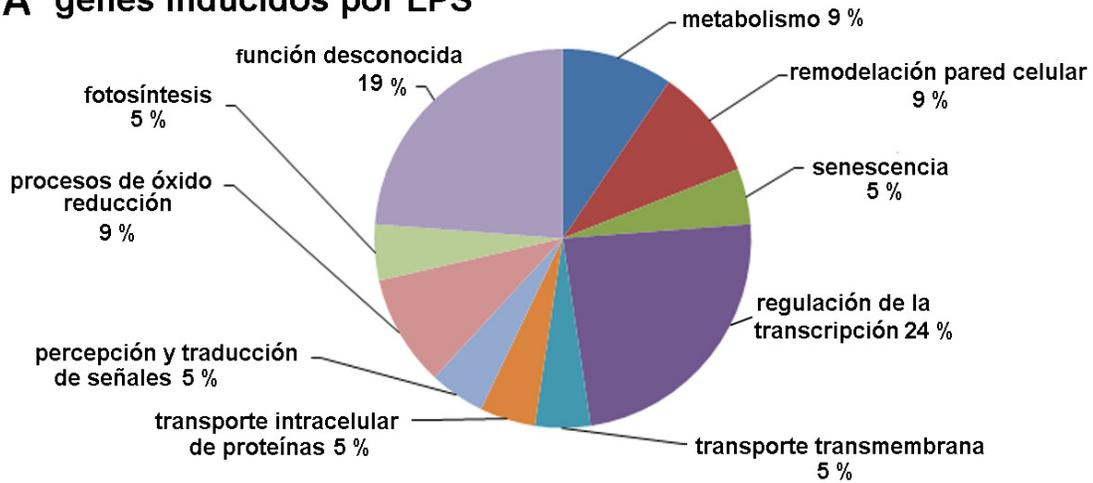


Figura 38. Clustering de los genes diferenciales. Los perfiles de expresión de los 304 genes diferenciales de las muestras de raíz tratadas con YEM/CE3/CE109 (A), YEM/CE3/CE338 (B), YEM/CE3/NodA⁻ (C), YEM/CE3/CE343 (D) fueron agrupados aplicando el algoritmo *k-means*. Las líneas grises corresponden a los niveles de mRNA de genes individuales, mientras que las líneas rosas marcan el patrón de expresión promedio de cada *cluster*. El algoritmo *k-means* fue realizado con el software bioinformático GENESIS (Sturn y col., 2002 <http://genome.tugraz.at>).

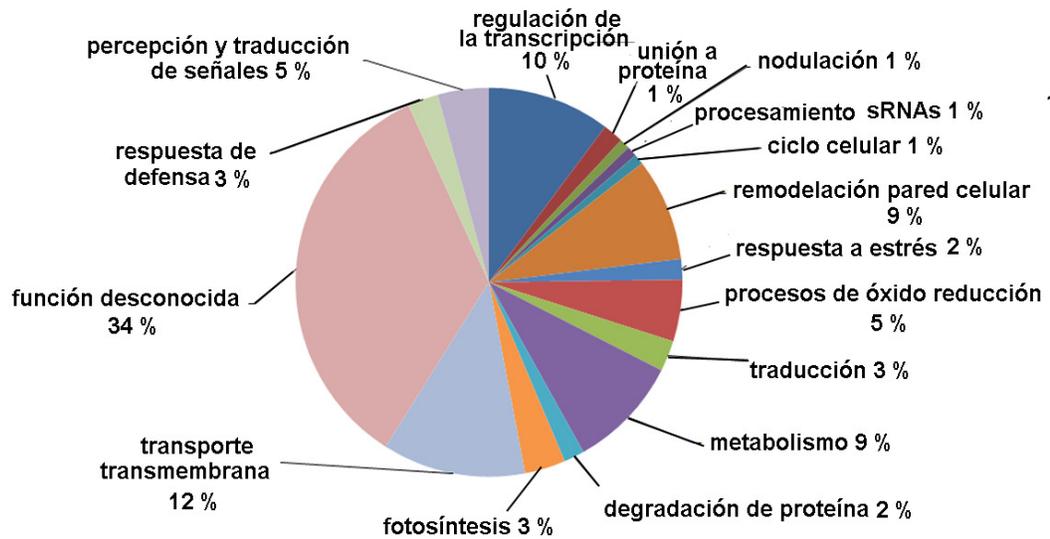
Para asignar una función a los genes regulados por EPS, LPS o NF se realizó una clasificación funcional en base a la categorización definida por el *Gen Ontology Consortium*, realizada con el software Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>), considerando solamente los genes de los *clusters* seleccionados. Este análisis permitió identificar que las moléculas de LPS, EPS y NF regulan principalmente genes implicados en la regulación de la transcripción y de función desconocida. El resto de las categorías incluyó diversos procesos como metabolismo, remodelación de pared celular, transporte transmembrana, fotosíntesis, senescencia, respuesta a estrés, traducción, respuestas de defensa, tráfico de vesículas, fusión de membranas, procesamiento de pequeños RNAs (sRNAs), citoesqueleto o presentaron una función desconocida (figura 39 A-C). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en un análisis por RNAseq de *M. truncatula* (Boscari et al., 2013). Considerando que nuestra hipótesis principal consiste en que las moléculas EPS y LPS modulan diversos procesos en etapas tempranas de la simbiosis, nuestro análisis se focalizó en la lista de genes candidatos clasificados en algunos de los procesos biológicos que tienen lugar en las etapas iniciales de la respuesta al rizobio e infección, como son la regulación de la transcripción, percepción y traducción de señales, modulación de respuesta de defensa y estrés, procesamiento de sRNAs y remodelación de pared celular. Sin embargo, será necesario validar la expresión diferencial de algunos genes candidatos mediante RT-qPCR.

Categorización funcional de genes regulados por LPS

A genes inducidos por LPS

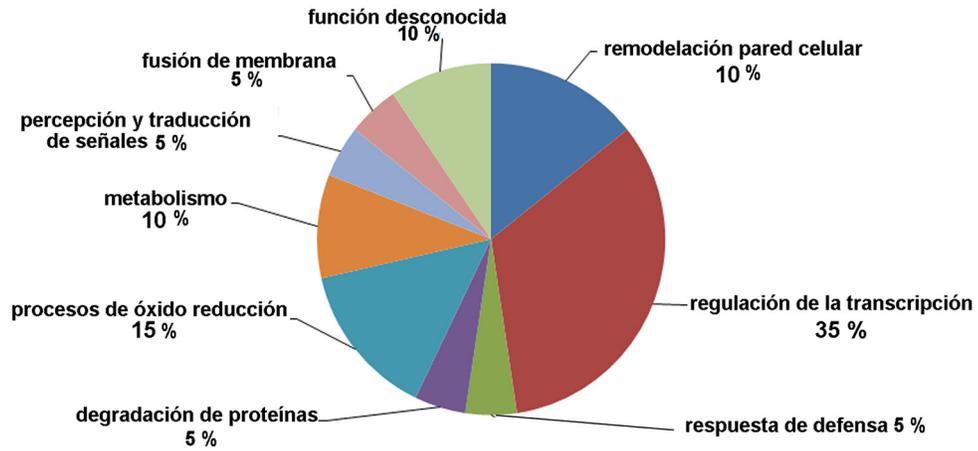


genes reprimidos por LPS

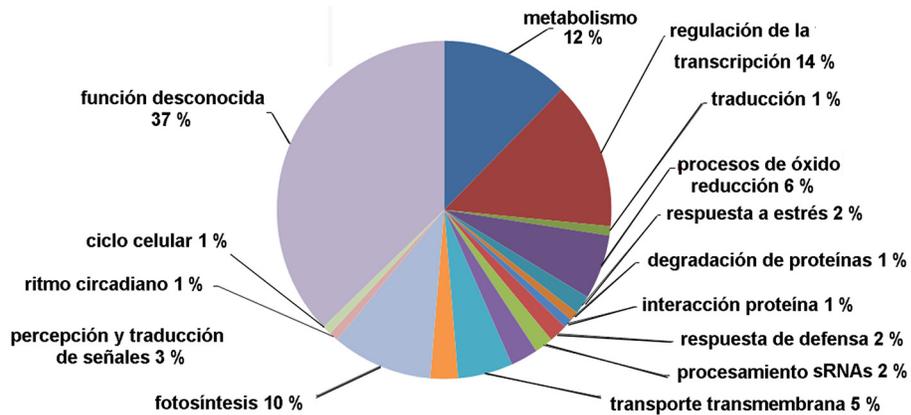


Categorización funcional de genes regulados po EPS

B genes inducidos por EPS

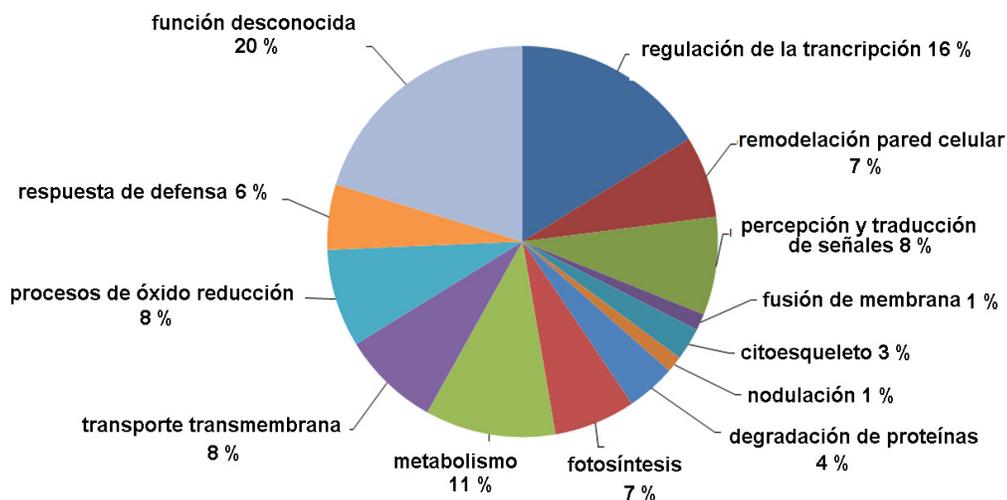


genes reprimidos por EPS



Categorización funcional de genes regulados por NF

C genes inducidos por NF



genes reprimidos por NF

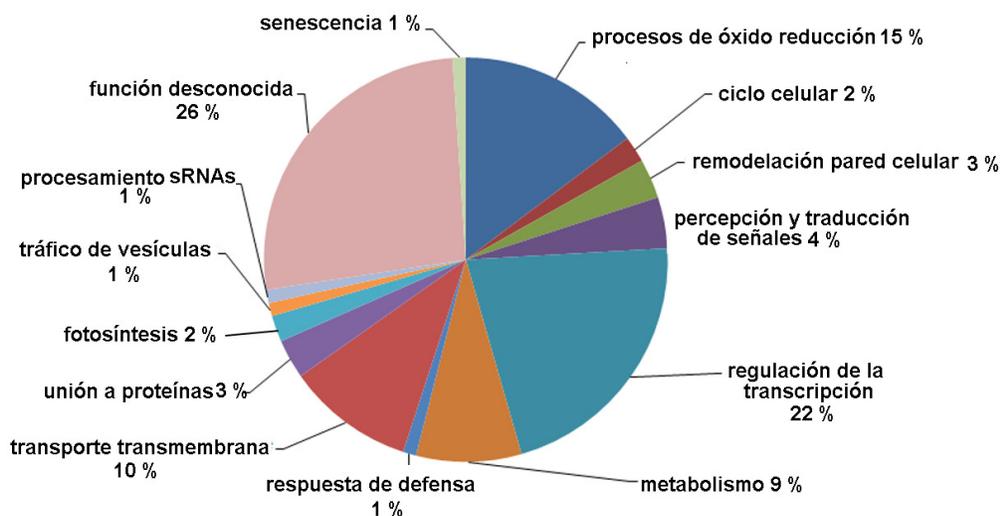


Figura 39. Clasificación funcional de los genes regulados por LPS, EPS y NF. La clasificación de los GO de los genes fue realizada en base a la categorización de los GO utilizando Blast2GO de los genes diferenciales clasificados por *k Clustering*. **A.** Clasificación funcional de los genes inducidos o reprimidos por LPS. **B.** Clasificación funcional de los genes inducidos o reprimidos por EPS. **C.** Clasificación funcional de los genes inducidos o reprimidos por NF.

Análisis de los factores de transcripción diferencialmente regulados por EPS, LPS y NF en *P. vulgaris* en etapas tempranas de la nodulación

A partir de los datos generados por RNAseq, el análisis realizado con *k Clustering* y la posterior clasificación funcional, se detectaron 37 factores de transcripción regulados por EPS, LPS y NF. Los TFs poseen dominios de unión a DNA, y pueden actuar solos o en combinación con otras proteínas formando complejos, promoviendo la unión de la RNA polimerasa, o actuando como represores y bloqueando la transcripción de ciertos genes. El efecto de la regulación transcripcional resulta en la regulación de procesos biológicos en respuesta a diversos estímulos bióticos, abióticos o actividades celulares, y como consecuencia, el conocimiento de la regulación génica es fundamental para entender la mayoría de los procesos biológicos. Para estudiar los TFs identificados se clasificaron según las familias definidas en el *Plant Transcription Factor database v3.0* (Jin et al., 2014). Los 37 TFs se distribuyeron en 12 familias - considerando los dominios anotados y la similitud de secuencia - denominadas: Co- like, GATA, NAC, Myb, Nin-like, AP2-ERF (*ethylene response factor*), GRAS, bZIP, bHLH, C3H, C2H y HB (homeobox) (tabla 6, figura suplementaria 2, Anexo III).

Se detectaron 6 miembros de la familia Co – like, cuyo nombre deriva de *Constant-like*. Esta familia incluye a los TFs del tipo *pseudo response regulators* (PRR), los cuales han sido asociados al control del ritmo circadiano, aunque no han sido profundamente estudiados, por lo que se desconoce si participan de otros procesos biológicos. Además, se ha descrito que los PRR contienen similitudes con sistemas de dos componentes de bacterias (Mizuno, 1998). Los datos de RNAseq indicarían que la mayoría de los miembros de esta familia son reprimidos por las moléculas de EPS y NF (figura suplementaria 2 A, Anexo III).

Mediante el análisis también se identificaron 8 miembros de la familia AP2-ERF (*Apetala2/ethylene response factors*). Esta familia se caracteriza por tener un dominio de unión al DNA denominado AP2 altamente conservado. Estos TFs han sido implicados en la regulación de procesos de desarrollo, en la respuesta a patógenos y en la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés (Solano et al., 1998; Berrocal-Lobo and Molina, 2004; Zhu et al., 2014). En *M. truncatula* se demostró que un miembro de esta familia denominado *ERN* (*ERF required for nodulation*) es necesario para la inducción de nodulinas, y para los eventos tempranos de la infección por rizobio (Middleton et al., 2007). En particular, el análisis por RNAseq permitió detectar un miembro inducido por NF con un dominio similar a AP11 (Phvul.001G111800), que corresponde al gen con mayor porcentaje

de identidad de secuencia a nivel de nucleótidos con el gen *ERN1* de *M. truncatula*. Los otros miembros de esta familia presentaron patrones de expresión que indicarían una regulación por NF y la combinación de las moléculas de LPS/EPS (figura suplementaria 2 B, Anexo III). La familia NIN (*Nodule Inception*) se caracteriza por presentar dominios RWP-RK de unión a DNA. Previamente se describió un miembro de esta familia denominado *NIN* implicado en el proceso de infección del rizobio y en la organogénesis del nódulo (Schäuser et al., 1998; Marsh et al., 2007). Los datos de RNAseq indican que los dos miembros identificados en nuestro análisis se encuentran inducidos por NF, y estos resultados son compatibles con los resultados publicados en *L. japonicus* y *M. truncatula* (figura suplementaria 2 C, Anexo III). En particular, el miembro Phvul.009G115800 corresponde al gen con mayor identidad de secuencia a nivel de nucleótidos con el gen *NIN* descrito en *M. truncatula*. La inducción de los ortólogos putativos de *ERN1* y *NIN* indica que las raíces utilizadas como material de partida para la construcción de las bibliotecas respondieron a la infección en la forma esperada (figura 37 y tabla 6).

También se encontró un TF perteneciente a la familia de TF GRAS similar a *SCARECROW like 14 (SCL14)* inducido por NF, regulado negativamente por LPS y clasificado en la subfamilia LISCL (figura suplementaria 2 C, Anexo III). En *A. thaliana* se describió que *SCL14* es esencial para la activación de promotores inducibles por estrés (Fode et al., 2008). Miembros de la familia GRAS controlan una gran diversidad de procesos de desarrollo, entre ellos el patrón de desarrollo de la raíz y la señalización por hormonas (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). En relación con la nodulación, se han descrito dos miembros de la familia GRAS denominados *NSP1* y *NSP2* que participan en la señalización por NF posteriormente a la activación de CCaMK (Catoira, 2000). Asimismo, en *P. vulgaris* se describió que un miembro correspondiente a la subfamilia PAT1, denominado *SIN1*, es necesario para el establecimiento de la infección y la elongación de raíces laterales (Battaglia et al., 2014). Será de interés estudiar la función de este gen candidato en el proceso de simbiosis.

Otro de los genes con expresión diferencial fue *sigmaE*, que codifica para un TF de procariontes integrado en el genoma de la planta, y podría actuar como regulador de la transcripción en mitocondrias o cloroplastos. Su función en la regulación de genes que participan en la nodulación se desconoce, aunque los datos de RNAseq indicarían una regulación negativa por NF (figura suplementaria 2 C, Anexo III). Respecto de los TFs tipo MYB, se conoce que participan en diversos procesos como metabolismo, respuesta a estreses abióticos y bióticos y en la síntesis de pared celular secundaria de las células del xilema

(Dubos et al.; Ko et al., 2014). En el análisis de datos de RNAseq se encontraron 3 miembros de esta familia (figura suplementaria 2 C, Anexo III). Los patrones de expresión de estos genes indicarían que el gen Phvul.011G109600 estaría inducido por la combinación de EPS, LPS y NF, mientras que Phvul.002G304400 sería inducido específicamente por NF. Otros 3 TFs regulados diferencialmente por EPS, LPS y NF corresponden a una de las familias de TF más grandes de plantas, NAC, cuyo nombre deriva de los miembros NAM (*no apical meristem*), ATAF (*Arabidopsis transcription activation factor*), CUC (*cup-shaped cotyledon*) (figura suplementaria 2 C, Anexo III). Estas últimas proteínas son reguladores clave de la percepción de estrés, programas de desarrollo y señalización por hormonas (Jensen et al., 2010). También se identificaron en el análisis TFs miembros de la familia zinc finger regulados por las moléculas de EPS/LPS y NF, uno perteneciente a la subfamilia C2H2 (Cys-2/His-2), y dos TFs del tipo zinc finger pertenecientes a la subfamilia C3H (Cys-3/His) (figura suplementaria 2 C, Anexo III). Los miembros de esta familia de TFs están implicados en una diversidad de procesos de desarrollo y de respuesta a estrés (Englbrecht et al., 2004; Devaiah et al., 2007). Por otro lado, se identificaron 2 TFs pertenecientes a la familia bZIP (*basic region/leucine zipper motif*), 4 miembros de la familia homeobox, 2 miembros de la familia GATA y 2 miembros de la familia bHLH (figura suplementaria 2 D, Anexo III). Las proteínas bZIP regulan procesos de defensa contra patógenos, señalización por luz y estrés, maduración de semillas y el desarrollo de la flor (Jakoby et al., 2002) y los dos miembros identificados estarían regulados negativamente por NF. Los TFs del tipo homeobox están involucrados en procesos de desarrollo, y en la biosíntesis y vías de señalización por hormonas (Wen et al., 2011). Dos miembros de esta familia de TFs se encontraron regulados negativamente por NF y EPS. Por su parte, las proteínas bHLH participan en el control de la división celular, desarrollo y recientemente se ha reportado una proteína bHLH implicada en nodulación (Heim et al., 2003; Chiasson et al., 2014). Además esta familia de TFs está implicada en la represión de las respuestas de defensa y procesos de desarrollo mediados por jasmonato (Lorenzo et al., 2004; Song et al., 2013). De acuerdo a los datos de RNAseq, los dos miembros de esta familia de TFs estarían reprimidos por NF. Los TFs del tipo GATA regulan genes del ritmo circadiano y de respuesta a la luz, y participan en la regulación del metabolismo de nitrógeno (Reyes et al., 2004).

Previamente, a partir de datos de RNASeq se describió que distintos miembros de las familias de TFs del tipo MYB, HB, RWP-RK, bZIP, bHLH, C2H2, NAC, Zinc finger, ZIM domain, ERF y GRAS están diferencialmente inducidos en nódulos de 10 DPI en *M. truncatula* (Moreau et al., 2011). Estos resultados concuerdan con los datos de RNAseq y

sugieren que algunos miembros de estas familias de TFs están implicados en la simbiosis tanto en etapas tempranas como posteriores de la nodulación. La profundización de la función de estos reguladores transcripcionales será de interés para dilucidar la contribución de los miembros de las distintas familias de TFs en plantas y la posible función en la infección por rizobio.

Llamativamente, se identificaron tres TFs inducidos por la combinación de NF, EPS y LPS; un TF del tipo MYB (Phvul.011G109600), y dos TF de la familia GATA: TF con dominio TIFY/motivo CCT divergente (Phvul.002G002000) y un TF con dominio ZIM-jasmonato (Phvul.003G129200). Además, se detectó que la combinación de moléculas de EPS y NF del rizobio regula negativamente miembros de la familia de TFs PRR, zinc finger C3H y la mayoría de los miembros HB. Sin embargo, para confirmar éstos datos de expresión será necesario validar los mismos mediante RT-qPCR con el objetivo de seleccionar los mejores genes candidatos para, posteriormente, evaluar mediante genética funcional el posible rol de dichos genes en la nodulación.

Tabla 6. Factores de transcripción diferencialmente regulados por EPS, LPS y NF en raíces de *P. vulgaris* 24 HPI. Se identificaron 37 TFs que fueron clasificados en las familias definidas en el *Plant Transcription Factor Database v3.0*.

regulación de la transcripción 24 HPI				
Id	Gen	inducidos por	reprimidos por	Familia
Phvul.011G070700	pseudo-response regulator 3	LPS	NF + EPS	Co-like
Phvul.007G162500	pseudo-response regulator 7		NF+EPS	Co-like
Phvul.010G119700	pseudo-response regulator 5		NF + EPS	Co-like
Phvul.011G070600	pseudo-response regulator 7		NF + EPS	Co-like
Phvul.009G045000	pseudo-response regulator 5		NF	Co-like
Phvul.011G053700	B-box zinc finger family protein		NF + EPS	Co-like
Phvul.002G002000	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein	LPS +EPS+NF		GATA
Phvul.003G129200	jasmonate-zim-domain protein 1	LPS +EPS+ NF		GATA
Phvul.004G077400	NAC domain containing protein 47	LPS +EPS	NF	NAC
Phvul.001G100200	NAC domain containing protein 47		NF	NAC
Phvul.002G275000	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	NF	LPS	NAC
Phvul.011G109600	myb domain protein 15	LPS +EPS+ NF		Myb
Phvul.006G120800	myb domain protein 78		EPS + LPS	Myb
Phvul.002G304400	myb-like transcription factor family protein	NF		Myb
Phvul.008G291800	Plant regulator RWP-RK family protein	NF		Nin-like
Phvul.009G115800	Plant regulator RWP-RK family protein	NF		Nin-like
Phvul.001G160500	ethylene response factor 1	NF	LPS+EPS	AP2/ERF
Phvul.007G193300	ethylene response factor 1		LPS+EPS	AP2/ERF
Phvul.002G055700	ethylene response factor 1		LPS+EPS	AP2/ERF
Phvul.001G160100	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	NF	LPS+EPS	AP2/ERF
Phvul.007G193900	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	NF	LPS+EPS	AP2/ERF
Phvul.008G246000	cytokinin response factor 4	EPS		AP2/ERF
Phvul.001G111800	Related AP2 11	NF		AP2/ERF
Phvul.008G019600	Related to AP2 6l		NF	AP2/ERF

Capítulo III. Resultados y Discusión

Phvul.005G145200	SCARECROW-like 14	NF	LPS	GRAS
Phvul.006G029200	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein		NF	bZIP
Phvul.008G023800	basic leucine-zipper 42		EPS + NF	bZIP
Phvul.001G126400	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein		NF	bHLH
Phvul.009G188200	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein		NF	bHLH
Phvul.009G075500	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein		EPS + NF	C3H
Phvul.002G042000	zinc knuckle (CCHC-type) family protein		NF + EPS	C3H
Phvul.002G075900	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	EPS		C2H2
Phvul.009G259700	Homeodomain-like superfamily protein		NF + EPS	HB
Phvul.009G259600	Homeodomain-like superfamily protein		EPS	HB
Phvul.001G143500	homeobox from Arabidopsis thaliana		NF	HB
Phvul.003G176800	Duplicated homeodomain-like superfamily protein		NF + EPS	HB
Phvul.009G137600	sigma factor E		NF	mitocondria/cloroplasto

Identificación de genes diferenciales implicados en percepción y transducción de señales regulados por EPS, LPS y NF

A partir de los datos de RNAseq y análisis de *clusters* se identificaron 10 genes implicados en percepción y transducción de señales regulados por EPS, LPS y NF (tabla 7, figura suplementaria 3, Anexo III). Dentro de este grupo, se detectaron diversos receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores tipo quinasa. En particular, se identificaron dos miembros previamente descritos en la nodulación; un receptor con dominio con motivos de lisina (*LysM domain*) y un receptor quinasa del tipo LRR (*Leucine rich repeats*) inducidos específicamente por NF. Dos miembros de la subfamilia de receptores del tipo LysM han sido identificados como los receptores de NF (Limpens et al., 2003; Arrighi et al., 2006), mientras que los receptores con dominio LRR están asociados a resistencia a patógenos (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Sin embargo, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se reportó en *P. vulgaris* un receptor LRR inducido 24 HPI con *R. etli* (Peltzer Meschini et al., 2008). Otro de los genes diferenciales corresponde a un gen que codifica un receptor quinasa con dominio de unión a la lectina Concaivalina A, perteneciente a la familia LecRK, regulado negativamente por EPS, LPS y NF. Las lectinas unen polisacáridos bacterianos y participan tanto en la modulación de la simbiosis como en respuestas de defensa. La función de los receptores LecRK en simbiosis no se encuentra completamente definida al presente. LecRK podría estar implicado en el reconocimiento de la bacteria y la modulación de la respuesta de defensa, sin embargo se deberían realizar experimentos funcionales para confirmar esta hipótesis. Otro de los genes diferenciales es un receptor de luz azul denominado *phototropin 2*, que controla una diversidad de procesos que optimizan la eficiencia fotosintética en plantas, como es el fototropismo, apertura de estomas inducida por luz, y movimientos de cloroplastos en respuesta a la intensidad de luz (Christie, 2007). Hasta el momento se desconoce la relación de estos fotoreceptores con la nodulación, y será de interés estudiar su posible función mediante ensayos funcionales..

Análisis de los genes diferenciales involucrados en biosíntesis de hormonas, procesos de óxido reducción y en respuestas de defensa y estrés regulados por EPS, LPS y NF

El análisis de transcriptómica permitió identificar 15 genes diferenciales que codifican para proteínas que participan en respuesta de defensa, reacciones de óxido reducción y biosíntesis de hormonas modulados por EPS, LPS y el NF (tabla 8, figura suplementaria 4 A y B, Anexo III). En particular, uno de los genes inducidos específicamente por el NF, denominado *low-molecular-weight cysteine-rich 68*, codifica para un péptido rico en cisteínas (CRP). Estos péptidos CRPs participan en señalización, procesos de desarrollo, respuesta a patógenos y en simbiosis (Marshall et al., 2011). En relación con la simbiosis, se han identificado péptidos ricos en cisteína específicos de nódulos denominados NCRs (*nodule cystein rich*), que son responsables de la diferenciación de los rizobios a bacteroides en nódulos de *M. truncatula* (Van de Velde et al., 2010). Por otro lado, se identificaron cuatro genes diferenciales que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de hormonas, *zeaxanthin epoxidase (ZEP)*, *gibberellin 20 oxidase* y *abscisic aldehyde oxidase 3* y *lipooxygenase 1*. Respecto de los genes de defensa, se detectó una represión en los niveles de expresión de *germin 3* por LPS y EPS. Esta enzima está implicada en la respuesta a patógenos entre otros procesos (Bernier and Berna, 2001). Asimismo, en el análisis se encontraron dos miembros de la familia *LEA* (*late embryogenesis abundant protein*), sin embargo, uno de los genes identificados (Phvul.007G225200) se detectó inducido específicamente por el NF. Las proteínas LEA son altamente hidrofílicas, se inducen en respuesta a estrés hídrico y participan en procesos de desarrollo (Battaglia and Covarrubias, 2013). Dentro de esta clasificación también se encontraron genes con expresión diferencial que codifican proteínas asociadas a la regulación del estado de óxido-reducción como son enzimas peroxidasas y la enzima oxidoreductasa dehidrogenasa con dominio de unión a zinc. En conjunto estos resultados sugieren un rol del EPS y LPS en la modulación de respuesta de defensa y las vías de señalización por hormonas.

Tabla 7. Genes que se expresan diferencialmente clasificados la categoría de percepción y transducción de señales regulados por LPS, EPS y NF en raíces de *P. vulgaris* 24 HPI.

Percepción y transducción de señales			
Id	Anotación funcional	inducidos por	Reprimidos por
Phvul.007G049400	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	LPS+EPS+NF	
Phvul.004G158000	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein		EPS+ NF+LPS
Phvul.007G129500	Signal transduction histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor	NF	LPS
Phvul.003G149200	Protein kinase superfamily protein	NF	
Phvul.004G124100	Protein kinase superfamily protein	NF	
Phvul.002G059500	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	NF	
Phvul.009G131600	wall-associated kinase 2	NF	
Phvul.009G180700	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	NF	
Phvul.008G069500	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein		NF
Phvul.003G274800	phototropin 2		EPS

Tabla 8. Genes diferenciales involucrados en respuesta de defensa, biosíntesis de hormonas y procesos de óxido reducción regulados por LPS, EPS y el NF en raíces de *P. vulgaris* 24 HPI.

Respuestas de defensa y reacciones de óxido reducción			
Id	Gen	inducidos por	reprimidos por
Phvul.006G075600	Peroxidase superfamily protein	LPS +EPS	NF
Phvul.008G218500	Peroxidase superfamily protein	NF	
Phvul.008G210000	abscisic aldehyde oxidase 3		NF
Phvul.010G134900	lipxygenase 1 (JA biosynthesis)		LPS+EPS
Phvul.007G225200	late embryogenesis abundant protein (LEA)	NF	LPS + EPS
Phvul.003G237400	Late embryogenesis abundant protein (LEA)		EPS+LPS+NF
Phvul.003G286300	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein		NF
Phvul.004G014100	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	EPS+NF	
Phvul.010G129700	germin 3		EPS + LPS
Phvul.009G203600	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	NF	
Phvul.003G282400	low-molecular-weight cysteine-rich 68	NF	
Phvul.011G019300	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	NF	
Phvul.002G319200	PLANT CADMIUM RESISTANCE 2	NF	
Phvul.009G131500	gibberellin 20 oxidase 2 (GA biosynthesis)	NF	
Phvul.003G243800	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)		EPS + NF

Análisis de genes implicados en la remodelación de pared celular regulados por EPS, LPS y el NF

Se identificaron 14 genes diferenciales regulados por las moléculas de EPS, LPS y el NF que codifican para proteínas que participan en procesos de remodelación de pared (tabla 9, figura suplementaria 5 A y B, Anexo III). Este proceso biológico está involucrado en el inicio y progresión del IT, así como también en la liberación de rizobio en las células corticales del primordio del nódulo. Entre los genes diferenciales de esta categoría, se encontraron 4 miembros de la familia de expansinas reguladas por las moléculas de EPS, LPS y NF. La función de las expansinas está asociada a la remodelación y relajamiento de la pared celular (Cho and Cosgrove, 2000). Estas proteínas podrían estar implicadas en la invasión del rizobio por el IT, o incluso en la división celular de las células del córtex. También se detectaron en el análisis 3 acyl transferasas del tipo HXXXD, reguladas por las moléculas de LPS, EPS y NF. En particular uno de los miembros (Phvul.006G211000) se identificó regulado positivamente por las moléculas de EPS y el NF. Las acyl transferasas del tipo HDXXXD catalizan entrecruzamientos entre polisacáridos de la matriz de la pared celular y participan en la reconstrucción de la red estructural en la pared celular (Okazawa et al., 1993). Por otro lado, se registraron regulados positivamente por el NF genes que codifican para dos glicosil hidrolasas con dominio quitinasa y una enzima celulasa. En contraste, se detectó que el NF regularía negativamente el gen denominado *TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 41*, involucrado en la remodelación de la pared celular. Las glicosil hidrolasas y quitinasas participan en la hidrólisis selectiva de uniones glicosídicas, por tanto son cruciales para la degradación y expansión de la pared celular (Davies and Henrissat, 1995). En conjunto, estos resultados sugieren que las moléculas de EPS, LPS y NF regulan genes que participan en la remodelación de la pared celular. En conclusión, el análisis de RNAseq permitió obtener una lista de genes candidatos con una posible función asociada al proceso de infección y crecimiento del IT.

Tabla 9. Genes candidatos involucrados en procesos de remodelación de pared celular regulados por LPS, EPS y NF en raíces de *P. vulgaris* 24 HPI.

Remodelación pared celular			
id	Gen	inducido por	reprimido por
Phvul.002G001700	expansin-like B1	EPS	NF
Phvul.005G104600	expansin B3		LPS
Phvul.003G224800	expansin-like B1		NF
Phvul.002G083600	expansin A15		LPS
Phvul.010G005200	HXXXD-type acyl-transferase		LPS +EPS
Phvul.008G226200	HXXXD-type acyl-transferase		EPS
Phvul.006G211000	HXXXD-type acyl-transferase	NF+EPS+LPS	
Phvul.011G075000	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 11		LPS
Phvul.001G239900	Cellulose 2	NF	
Phvul.001G046400	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	NF	
	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	NF	
Phvul.003G158800	Glycosyl hydrolase family protein	LPS+EPS	
Phvul.001G112700	SKU5 similar 4		LPS+EPS
Phvul.003G080100	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 41		NF

Identificación de genes diferenciales involucrados en el procesamiento de pequeños RNAs regulados por EPS, LPS y NF

Los determinantes moleculares involucrados en la regulación de la nodulación no se han dilucidado completamente. El descubrimiento de pequeños RNA (sRNAs) ha sido clave para investigar mecanismos de regulación en la nodulación (Boualem et al., 2008; Subramanian et al., 2008). Los sRNAs son moléculas de 20-24 nts que actúan como reguladores transcripcionales o post-transcripcionales de la expresión génica. En esta categoría se encuentran dos tipos de sRNAs en plantas: los miRNAs (micro RNAs) y los siRNAs (*small interfering RNAs*) (Axtell, 2013). En el presente trabajo, se identificó un gen que presenta alta identidad de secuencia de nucleótidos con AGO7 (Argonauta 7) de *A. thaliana* y un gen que codifica una proteína con dominio XH/XS (tabla 10, figura suplementaria 6, Anexo III). Ambas proteínas están involucradas en el procesamiento de sRNAs y los niveles de expresión de AGO7 sugieren una regulación negativa mediada por las moléculas de NF, EPS y LPS. Por otro lado, los datos indicarían que la molécula de EPS regularía negativamente los niveles de expresión del gen correspondiente a la proteína XH/XS. Argonauta es el componente catalítico del complejo RISC, une RNAs doble cadena y posee actividad endonucleasa. En *A. thaliana* AGO7 participa específicamente en la vía de producción de tasiRNAs (*trans acting small interfering RNA*) a partir de TAS3 (transcripto no codificante del que derivan tasiRNAs). Los targets de los tasiRNAs son los transcritos de los factores de respuesta a auxina denominados ARF2, ARF3 y ARF4 (Cuperus et al., 2010). Por otra parte, las proteínas con dominios XH/XS unen dsRNA y serían responsables de la metilación del DNA, y por ende estarían involucradas en el mecanismo de acción de los siRNA de heterocromatina (Butt et al., 2014). Estos resultados sugieren que las moléculas de EPS y LPS podrían regular mecanismos de regulación post transcripcional en etapas tempranas de la infección por rizobio. Para profundizar la función de estos genes en la simbiosis será necesario realizar un análisis funcional y un estudio de las poblaciones de sRNAs en las mismas muestras caracterizadas.

Tabla 10. Genes diferenciales involucrados en el procesamiento de sRNAs regulados por LPS, EPS y NF en raíces de *P. vulgaris* 24 HPI.

Procesamiento de sRNAs			
Id	Anotación funcional	inducido por	reprimido por
Phvul.003G046700	Argonaute family protein		NF + EPS+ LPS
Phvul.003G281400	XH/XS domain-containing protein	LPS+ NF	EPS

Señalización por etileno, giberelina, jasmonato y ABA reguladas por las moléculas de EPS, LPS y NF

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa constitutivos e inducibles contra patógenos. Uno de estos mecanismos es la inducción de genes de respuesta de defensa como consecuencia de la acción sinérgica de dos fitohormonas, el etileno y el jasmonato. Los resultados obtenidos por transcriptómica sugieren que las moléculas de EPS, LPS y NF del rizobio regulan la vía de señalización por etileno y jasmonato (Feys and Parker, 2000; Glazebrook, 2001). En *Arabidopsis*, el etileno es reconocido por sus receptores (Hua et al., 1998) y como consecuencia se desbloquea la proteína de respuesta a etileno ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2). La liberación de EIN2 activa el TF EIN3/EIN3-like1 (Chao et al., 1997), permitiendo la expresión de TFs secundarios, incluyendo los TF del tipo ERF1. Estas proteínas regulan la expresión de genes de defensa y relacionados con estrés, consecuentemente aumentando la tolerancia de la planta (Solano et al., 1998). En *M. truncatula* el etileno cumple un rol fundamental en la formación del IT, inhibe y regula la frecuencia del *calcium spiking* luego de la percepción del NF, participa en el crecimiento de la raíz y en diversas especies de leguminosas reduce el número de nódulos (Oldroyd et al., 2001; Penmetsa et al., 2003). Además, en trabajos previos llevados a cabo en *M. truncatula* se demostró que esta fitohormona actuaría *upstream* o durante el *calcium spiking*. Recientemente se demostró que el NF generaría un *feedback* negativo a través de la señalización por etileno (Miyata et al., 2013). En el presente trabajo, se identificaron 5 miembros de la familia de TFs de respuesta a etileno (ERF1) regulados negativamente por EPS y LPS.

Dentro de la vía de señalización por etileno, también se detectaron genes correspondientes al sistema de dos componentes regulados diferencialmente por EPS, LPS y NF. Este sistema consta de dos transductores de señal, un sensor histidin quinasa (HK) y un regulador de respuesta *response regulator* (RR). En general, HK fosforila el correspondiente RR ante un estímulo en particular, y la proteína RR activada actúa regulando a nivel transcripcional un

determinado evento. Uno de los genes candidatos identificados corresponde a un miembro de la familia sensor HK híbrido reprimido por la combinación LPS y EPS. Por otro lado, varios miembros de la familia PRR fueron regulados negativamente por NF y EPS. Los PRR son un caso atípico de RR que no parecen estar involucrados en la transducción de señal por fosforilación y se los ha asociado a la regulación del ritmo circadiano (Ishida et al., 2009). Considerando que no se han descrito PRRs asociados en la regulación de eventos tempranos de la nodulación, será de interés profundizar el estudio de la función de estos TFs en la simbiosis. Los resultados sugerirían que la señalización por etileno es reprimida por las moléculas señal LPS y EPS y podría tener una función en la supresión de las respuestas de defensa requerida para la progresión de la infección del rizobio.

Los TFs con dominio ZIM- jasmonato participan en las vías de señalización por ácido jasmónico. El jasmonato posee un efecto similar al etileno, afecta negativamente el número de nódulos y regula el *calcium spiking* (Miwa et al., 2006a; Samaj et al., 2006). Sin embargo, el análisis por RNAseq detectó un TF con dominio ZIM-jasmonato inducido por la combinación de las moléculas de EPS, LPS y NF. Éste último resultado es consistente con datos de transcriptómica de *M. truncatula* y sugieren una compleja función de esta fitohormona en la nodulación (Moreau et al., 2011). Será de interés estudiar por análisis funcional el rol de este TF en las etapas tempranas de la simbiosis. Por otro lado, los TFs del tipo MYB participan en la regulación de la síntesis de antocianinas en respuesta a factores abióticos. Las antocianinas poseen, entre otras funciones, actividad antimicrobiana y antifúngica (Peel et al., 2009). Sin embargo, se han descrito algunos miembros de esta familia como reguladores negativos de la síntesis de antocianinas (Aharoni et al., 2001; Dubos et al., 2008). A partir de los datos de RNAseq se detectaron dos proteínas MYB inducidas por las moléculas de NF, EPS y LPS. Una hipótesis posible sería que este tipo de TF regule negativamente la síntesis de antocianinas, modulando entonces la respuesta de defensa de la planta.

Además, se detectaron tres genes regulados diferencialmente que codifican enzimas de la vía biosintética de fitohormonas: *Zeaxanthin epoxidase* (ZEP), *Gibberellin 20-oxidase* y *abscisic aldehyde oxidase 3*. ZEP y *abscisic aldehyde oxidase 3* catalizan reacciones de la biosíntesis de ácido abscísico (ABA), una hormona que participa en el desarrollo de la semilla y en respuesta a estrés (E Marin, 1996; Seo et al., 2000). Los datos de RNAseq indicarían una represión de la biosíntesis de ABA por las moléculas NF y EPS. La enzima *Gibberellin 20-oxidase* cataliza algunos pasos consecutivos en la biosíntesis de ácido giberélico o giberelina (GA) y se detectó inducida por NF. Esta última fitohormona está involucrada en varios

procesos de desarrollo, incluyendo germinación, extensión del tallo, floración y maduración del fruto (Phillips et al., 1999). La inducción por NF de genes involucrados en la biosíntesis de giberelina (GA) es consistente con lo reportado con datos de RNAseq en *M. truncatula* 12 HPI con *S. meliloti*, y corroboran la hipótesis que GA participaría en el proceso de infección y la formación del primordio del nódulo (Hayashi et al., 2012).

En conjunto, los genes con regulación diferencial implicados en la señalización por hormonas constituyen excelentes candidatos para estudiar la función del EPS, LPS y NF en la modulación de los eventos tempranos de la simbiosis.

Conclusión general

Los datos generados a partir de RNAseq en esta Tesis Doctoral constituyen una fuente de información valiosa para analizar los procesos biológicos que ocurren en etapas tempranas de la nodulación. El análisis permitió detectar que las moléculas de EPS, LPS y NF modulan vías de señalización por hormonas, probablemente implicadas en la regulación de las respuestas de defensa de la planta. Además, es posible hipotetizar que los receptores identificados en este análisis participen en el reconocimiento del rizobio en las etapas de la infección. Otro resultado de interés fue la gran proporción de genes diferenciales que codifican TFs y proteínas de remodelación de pared celular regulados por NF, EPS y LPS. Los resultados permiten especular sobre los procesos que tienen lugar durante la infección, sin embargo, será indispensable realizar ensayos de RT-qPCR para validar los datos de RNAseq y realizar análisis funcionales para estudiar la participación de los genes candidatos en la simbiosis fijadora de nitrógeno. Asimismo, logramos identificar dos genes diferenciales que participan en el mecanismo de acción de sRNAs que participan en producción de tasiRNAs y en la modificación de la cromatina (argonautas y metilasas de DNA), que constituye un proceso biológico poco explorado en simbiosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las especies vegetales utilizadas fueron *P. vulgaris* (poroto común) variedad Nag12 (de origen mesoamericano), provista por Susana García Medina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Salta, Cerrillos, Argentina) y *M. truncatula* variedad Jemalong A17 provista por el Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Montpellier, Francia. Las plantas de *P. vulgaris* y *M. truncatula* fueron crecidas en cámaras de crecimiento a una temperatura promedio de 26 °C y 25 °C, respectivamente, con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y 80 % de humedad.

Medio Fahraeus

El medio Fahraeus (Fahraeus, 1957) se utilizó para el crecimiento *in vitro* de plantas y para el crecimiento en potes con vermiculita. Su composición consiste en: CaCl₂.2H₂O 114 g/l, MgSO₄.7H₂O 120 g/l, citrato férrico 5 g/l, KH₂PO₄ 100 g/l, Na₂HPO₄ 150 g/l, micro elementos: KCl 3,73 g/l, H₃BO₃ 1,55 g/l, SO₄Mn.H₂O 0,85 g/l, CuSO₄.5H₂O, 0,13 g/l ZnSO₄.7H₂O, 0,58 g/l, Na₂MoO₄.2H₂O 0,018 g/l. Para el crecimiento *in vitro* se agregaron 10 g/l de agar. En el caso de los ensayos de crecimiento sin la inoculación con rizobio, las plantas fueron cultivadas en medio Fahraeus con KNO₃⁻ 0.8 mM.

Esterilización y germinación de semillas de *P. vulgaris* y *M. truncatula*

La superficie de las semillas de *P. vulgaris* fue esterilizada por tratamiento con etanol 70 % durante 30 seg y posteriormente se incubaron en hipoclorito de sodio 20 % durante 15 min con agitación suave. Luego se realizaron seis lavados sucesivos con agua destilada estéril y se colocaron en cajas estériles de acrílico conteniendo papel húmedo. La germinación requirió 3 días a 28 °C en oscuridad. Posteriormente, las semillas de *P. vulgaris* fueron transferidas a cajas de acrílico (de dimensiones de 22 cm x 22 cm x 1,5 cm) conteniendo agar-Fahraeus, o en caso de proceder a la generación de plantas compuestas, a vasos plásticos conteniendo vermiculita suplementada con medio Fahraeus.

Para la esterilización superficial de las semillas de *M. truncatula*, las mismas fueron escarificadas químicamente por tratamiento con H₂SO₄ 98 % (v/v) y agitación hasta la aparición de puntos negros en las semillas. El H₂SO₄ fue removido y se realizaron tres lavados con agua destilada a 4 °C. Luego las semillas fueron tratadas con hipoclorito de sodio

12 g/l durante 5 min seguido de seis lavados con agua destilada estéril. Para la germinación *in vitro*, las semillas fueron transferidas a placas de Petri conteniendo agar-H₂O 8 % (p/v) y mantenidas a 4 °C en oscuridad durante dos días para sincronizar la germinación y para el desarrollo de radículas rectas. Posteriormente, las mismas placas fueron colocadas a 25 °C por aproximadamente 30 h previo a la transformación de las radículas con *A. rhizogenes*.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Tabla 11. Cepas de *E. coli*

Cepa	Aplicación	referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Cepa utilizada para la multiplicación y manutención de plásmidos.	Taylor, RG et al.,1993
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa provista por el proveedor del sistema GATEWAY utilizada para la transformación y manutención de los vectores derivados de pENTRY/D-TOPO (INVITROGEN).	Invitrogen
<i>E. coli</i> <i>ccdB</i> survival 2 TR1	Cepa provista por INVITROGEN para la manutención de los vectores que contienen el gen <i>ccdB</i> .	Invitrogen

Tabla 12. Cepas de rizobios utilizadas y sus fenotipos

Cepa	Características ¹	Fenotipo en placa	Fenotipo Simbiótico ²	hospedante
<i>R. etli</i> SC15	-	Mucoso	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> 55N1	-	Mucoso	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE3	-	Mucoso	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE3 (NodA ⁻)	NodA ⁻ (NF)	Mucoso	Ndv ⁻ Fix ⁻	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE109	Ops ⁻ (LPS)	Mucoso	Ndv ⁻ Fix ⁻	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE338	Exo ⁻ (EPS)	No mucoso	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE343	Ops ⁻ Exo ⁻ (LPS,EPS)	No mucoso	Ndv ⁻ Fix ⁻	<i>P. vulgaris</i>
CFNX5 DsRed	Expresa IDsRED	Mucoso	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>P. vulgaris</i>
<i>S. meliloti</i> 1021	-	No	Ndv ⁺ Fix ⁺	<i>M.truncatula</i>

¹ NodA⁻, incapaz de sintetizar NF; Ops⁻, deficiente en la producción de LPS; Exo⁻, deficiente en la producción de EPS. ² El fenotipo Ndv refiere a la formación normal de nódulos (Ndv⁺) o a su ausencia (Ndv⁻), mientras que Fix corresponde a nódulos rosas fijadores (Fix⁺) o no (Fix⁻).

Tabla 13. Cepas de *A. rhizogenes* utilizadas para la transformación de *P. vulgaris* y *M. truncatula*

Cepa	Aplicabilidad	Referencia
<i>A. Rhizogenes</i> K599	Cepa requerida para la generación de raíces transgénicas en <i>P. vulgaris</i>	Bond and Gresshoff, 1993
<i>A. rhizogenes</i> ARqua1	Cepa utilizada para la generación de raíces transgénicas en <i>M. truncatula</i>	Quandt 1993

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

YEM (*Yeast Extract Mannitol*)

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *R. etli*. Composición: Extracto de levadura 0,4 g/l, manitol 7 g/l, NaCl 0,1 g/l, SO₄Mg 0,2 g/l, HPO₄HK₂ 0,5 g/l pH 7.

LB (Luria-Bertrani)

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli*, *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*. Composición: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l.

TY

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *S. meliloti*.

Composición: triptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, CaCl₂H₂O 0.7 g/l. Para los medios sólidos, se agregó 10 g/l de agar.

Las cepas de *E. coli* DH5 α , TOP10 y *ccdB survival 2* TR1 fueron crecidas en medio LB líquido a 37 °C y 250 rpm de agitación, o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB adicionado con agar. Las cepas de *A. rhizogenes* fueron crecidas en medio LB líquido o sólido suplementado con los antibióticos respectivos a 28 °C y con agitación a 250 rpm en caso de crecimiento en medio LB líquido. Las cepas de *R. etli* y *S. meliloti* fueron crecidas en placas de Petri con medio YEM o TY sólido o líquido, respectivamente, suplementado con los antibióticos correspondientes a 28 °C y a 250 rpm.

Concentración de antibióticos

Cultivos de <i>E.coli</i>	Cultivos de <i>A. rhizogenes</i>
Cloranfenicol 35 µg/ml	Cloranfenicol 200 µg/ml
Kanamicina 50 µg/ml	Kanamicina 50 µg/ml
Espectinomicina 50 µg/ml	Espectinomicina 200 µg/ml

Cepa de rizobio	Antibiótico
CFNX5 DsRed	Tetraciclina 4 µg/ml
<i>S. meliloti</i> 1021	Estreptomina 400 µg/ml

Técnicas de DNA recombinante**Minipreparación de DNA plasmídico**

A partir de una colonia bacteriana se inocularon 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente al plásmido de interés. Luego el cultivo fue incubado a 37 °C en agitación durante aproximadamente 12 hs y finalmente se obtuvo un precipitado de células por centrifugación a 6000 g durante 10 min. A partir del precipitado se procedió a la minipreparación de DNA plasmídico mediante la utilización del *kit Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Electroforesis de DNA

Para analizar la integridad y concentración del DNA plasmídico purificado, así como los productos de PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa en un rango de 0,8 - 2 % p/v teñidos con bromuro de etidio en un *buffer* TBE 0,5X a voltaje constante (Tris base 0,045 M, H₃BO₃ 0,045 M, EDTA 0,5 mM) junto con un marcador de peso molecular. Las muestras fueron resuspendidas en buffer de siembra 1X (buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, sacarosa 50 % p/v, azul de bromofenol 1 % p/v, EDTA 2 mM pH 8,0). Finalmente los geles fueron visualizados por exposición a luz UV en un transiluminador y la imagen fue capturada con una cámara digital Kodak DC120, utilizando el programa *Kodak Digital Science*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las concentraciones finales de los reactivos en la reacción de PCR en un volumen final de 20 μ l fueron: buffer de reacción 1X, $MgSO_4$ 1,5 mM (PBL-UNQ), dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,25 μ M, y enzima Taq Polimerasa 0,5 U (PBL-UNQ). Las reacciones de PCR fueron realizadas en el ciclador térmico *Mastercycler gradient* (Eppendorf). El tiempo de elongación del producto y la temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados fue variable para cada reacción utilizada. El programa estándar consistió en una primera incubación a 94 °C por 5', seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 52 °C (o T_m indicado), 1 min por kb a 72 °C y como paso final 10 min a 72 °C. En la tabla 14 se encuentran los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR y RT-qPCR.

Tabla 14. Lista de oligonucleótidos utilizados para análisis de RT-qPCR, PCR y mutagénesis dirigida.

primers	secuencia	referencia
RabA2 Q64L F mutagenesis	GAAGACTGTGAAAAGCATTGATCTGGGACACAGCAGG	este trabajo
RabA2 S26N F mutagenesis	AGGTGTTGGCAAAAACAACATCCTTTCAAGGTTTC	este trabajo
RABA2 R mutagenesis	TTTGCCAACACCTGAGTCTCCGATCAAAAAC	este trabajo
qEF1- α F	AACTACCACCGGCCACTTGAT	Peltzer Meschini et al., 2008
qEF1- α R	AGCACCCAGGCATACTTGAAT	Peltzer Meschini et al., 2009
qRabA2 F	TTGGCGGAGAGGGAAGGTC	Peltzer Meschini et al., 2010
qRabA2 R	TGCGAGTGCCTTTTTGCTAACA	Peltzer Meschini et al., 2011
OCS 3' R	CATGCGATCATAGGCGTCTCG	Reynoso et al., 2013
RabA2 OE F	CACCATGACGCATCGAGT	este trabajo
RabA2 OE R	CTAAGTGGAGCAGCAGCC	este trabajo
Nod C F	TGCTTGACACAACCAGCACTG	Zanetti et al., 2010
Nod C R	GACAGCCAGTCGCTATTGGTCA	Zanetti et al., 2010
qNIN F	CCAGATCGATCACTTCAGCAACATTC	este trabajo
qNIN R	GCACCAAGGCTCCATATTCCATC	este trabajo
qERN F	CTTCTCGAATTCGGAATCTT	Zanetti et al., 2010
qERN R	TGTTGCCATTGCCATTGTT	Zanetti et al., 2010
qENOD40 F	AGTTTTGTTGGCAAGCATCC	Zanetti et al., 2010
qENOD40 R	TAAGCGCAAGCAAACCTGTTG	Zanetti et al., 2010
ARFA1a OE F	ATGGGATTGTCAATTCACGAAG	tesina de Lic. Virginia Savy
ARFA1a OE R	CTATGCCTTGTGCAATGTTG	tesina de Lic. Virginia Savy

Generación de células de *E. coli* DH5 α competentes químicas

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α crecido durante toda la noche a 37 °C a 250 rpm, se realizó una dilución 1/100 del mismo y se dejó crecer hasta obtener una O.D₆₀₀ de entre 0,8 y 0,9. Luego se centrifugó a 2600 g por 10 min y el precipitado fue resuspendido en 12,5 ml de la solución de transformación 1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Luego se procedió a una centrifugación a 2600 g por 2 min y el precipitado fue resuspendido en 12,5 ml de solución de transformación 2 (MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6,5). Posteriormente se incubó el homogenato de células por 15 min en hielo, seguido de una centrifugación a 2600 g por 2 min. El sobrenadante fue removido, el precipitado de células fue resuspendido en 2,5 ml de solución 2 y posteriormente alicuotado y guardado a -80 °C.

Transformación de células de *E. coli* competentes

A partir de alícuotas de *E. coli* TOP10 o DH5 α competentes, se realizó el protocolo de transformación de competentes químicas (Sambrook, 2001). A las células competentes se adicionó entre 1 y 2 μ l de la reacción de recombinación o del plásmido de interés y posteriormente se incubó 30 min en hielo. Luego se procedió a realizar el tratamiento térmico a 42 °C por 30 seg seguido de 2 min en hielo y posterior incubación con medio LB durante 1 h a 37 °C. El cultivo fue centrifugado brevemente a 9447 g durante 1 min. Finalmente el precipitado fue resuspendido y esparcido en medio LB agar suplementado con el antibiótico requerido para la selección del plásmido de interés.

Generación de células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 electrocompetentes

A partir de un precultivo de 5 ml de *A. rhizogenes* K599 saturado se inocularon 50 ml de LB, y se dejó incubando a 28 °C y 250 rpm y hasta obtener una O D₆₀₀ de 0,7 - 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante aproximadamente 30 min y posteriormente se centrifugó a 6000 g durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 200 ml de glicerol 10 % (v/v), seguido de una centrifugación de 6000 g durante 10 min. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 4 ml de glicerol 10 %, alicuotado y almacenado a -80 °C.

Generación de células de *A. rhizogenes* ARqual electrocompetentes

Las células de *A. rhizogenes* ARqual fueron crecidas en medio LB a 30 °C y 150 rpm durante aproximadamente 12 h. Una alícuota del cultivo saturado fue utilizada para inocular 50 ml de

LB y se incubó hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6. Una vez alcanzada la absorbancia indicada, el cultivo fue enfriado en hielo por 15 min, seguido de una centrifugación a 6.000 g por 10 min. El precipitado fue resuspendido en 50 ml de glicerol 10 % (v/v) seguido de una centrifugación de 6000 g por 10 min, resuspensión en 25 ml de glicerol 10 % (v/v), centrifugación a 6000 g 10 min, resuspensión del precipitado en 4 ml de glicerol 10 %, centrifugación a 6000 g 10 min y finalmente el precipitado fue resuspendido en 500 µl de glicerol 10 % (v/v). Este último homogenato celular fue fraccionado en alícuotas y almacenado a -80 °C.

Transformación de células de *A. rhizogenes* K599 y *A. rhizogenes* ARqual electrocompetentes

Las células competentes se transformaron mediante 1 pulso de electroporación a 2,5 kV, utilizando el equipo electroporador *Bio-Rad Gene Pulser* (BioRad) y cubetas de electroporación de 2 mm de espesor estériles. En las cubetas se colocaron 50 µl de bacterias competentes previamente mezcladas con 2 µl del plásmido de interés e inmediatamente se procedió a la electroporación. Luego se agregó 1 ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se incubó 1 h a 28 °C para su recuperación. Finalmente la suspensión de células fue centrifugada brevemente a 6000 g y resuspendida en 100 – 200 µl que fueron sembrados en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes.

Mutagénesis dirigida

A partir de la secuencia codificante de *RabA2* clonada en el vector pTOPO TA (Invitrogen) se procedió a realizar la sustitución de bases puntuales para generar las versiones mutantes de *RabA2*. Las secuencias mutantes de *ARFAI* en el sitio catalítico fueron generadas por la Licenciada Virginia Savy (oligonucleótidos utilizados para mutagénesis disponibles en la tabla 14). Para la mutagénesis dirigida de *RabA2* se utilizó el *kit* de mutagénesis dirigida *Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis* (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos (tabla 14) para generar la sustitución de Gln en la posición 64 por una Leu (forma *RabA2*^{Q64L}) o de la Ser 26 por Asn (forma *RabA2*^{S26N}). Para la mutagénesis dirigida de la secuencia de *ARFAI*, se realizó la misma metodología que para la secuencia de *RabA2*, pero se realizó una

sustitución de Gln posición 71 por una Leu (forma *ARFA1*^{Q71L}) o la sustitución de Thr posición 31 por una Asn (forma *ARFA1*^{T31N}).

Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY

Para generar las construcciones de localización y sobreexpresión, los marcos abiertos de lectura de *RabA2*, *ARFA1* y sus versiones mutantes *RabA2*^{Q64L} y *RabA2*^{S26N}, *ARFA1*^{Q71L} y *ARFA1*^{T31N} fueron amplificados por PCR usando RabA2 OE F, RabA2 OE R, ARFA1 OE F y ARFA1 OE R (tabla 14), y clonados en el vector pENTR/ D - TOPO. Posteriormente se llevaron a cabo los clonados en los vectores de destino mediante recombinación utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones provistas por el proveedor. Para la sobreexpresión de RabA2 y las versiones mutantes se seleccionó el vector de destino binario GATEWAY p35S:HF-GATA, el cual permite la expresión del marco abierto de lectura como fusión al epítipo FLAG y 6 histidinas (6xHis) en el extremo amino terminal bajo el control del promotor fuerte CaMV35S (Mustroph et al., 2009). El epítipo FLAG permite detectar la sobreexpresión de las proteínas en las plantas transformadas mediante ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpos anti-FLAG.

Para el análisis de localización subcelular de RabA2 y sus versiones mutantes en *P. vulgaris*, el vector de destino seleccionado fue pMDC43 (Curtis and Grossniklaus, 2003), el cual permite una fusión traduccional del marco abierto de lectura al extremo C -terminal de *gfp* bajo el control del promotor p35S. La fusión se realizó en el extremo C terminal de GFP debido a la presencia de un sitio de prenilación en el C terminal de la proteína RabA2. Para evaluar la localización de *ARFA1*^{WT} en *M. truncatula* se utilizó el vector pk7RWG2 (*Department of Plant System Biology, University of GENT*) que permite la fusión del marco abierto de lectura al extremo amino terminal de la proteína fluorescente RFP bajo el control del promotor 35S. La fusión en el extremo amino terminal de RFP es debido a la presencia de un sitio de miristoilación en el amino terminal de ARFA1, que genera un anclaje lipídico que determina la localización de ARFA1 en membrana. Como controles de sobreexpresión se utilizaron los vectores pB7WG2D y pK7WG2D (Invitrogen). Las construcciones para localización y sobreexpresión fueron introducidas en *A. rhizogenes* K599 y *A. rhizogenes* ARqual mediante electroporación y luego utilizadas en la transformación de raíces de poroto y *M. truncatula*, respectivamente.

Ensayos biológicos

Generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* y *M. truncatula*

Transformación de *P. vulgaris* mediante *A. rhizogenes* K599

La transformación de *P. vulgaris* se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito (Bond and Gresshoff, 1993; Estrada-Navarrete et al., 2006; Blanco et al., 2009) utilizando plantas de *P. vulgaris* salvajes crecidas aproximadamente 5 días en vasos con vermiculita en las cámaras de crecimiento. Para los ensayos de sobreexpresión, se utilizaron suspensiones de *A. rhizogenes* K599 transformadas con el plásmido binario p35S:GFPGUS+ o los siguientes plásmidos p35S:FLAG-RabA2^{wt}, p35S:FLAG-RabA2^{Q64L} o p35S:FLAG-RabA2^{S26N}. Para los ensayos de localización, *A. rhizogenes* K599 fue transformada con p35S:GFP-RabA2^{wt}, p35S:GFP-RabA2^{Q64L}, p35S:GFP-RabA2^{S26N} y p35S:GFP como vector control (Blanco et al., 2009). La transformación de *P. vulgaris* consistió en realizar 3 inyecciones con jeringa Hamilton alrededor del nodo del cotiledón, generando pequeñas heridas en el tejido en contacto con la suspensión de *A. rhizogenes* K599. Una vez inoculadas, las plantas fueron transferidas a recipientes conteniendo vermiculita y regadas con medio Fahraeus suplementado con KNO₃ 8 mM. Las plantas transformadas se mantuvieron en las cámaras de cultivo durante 15 a 20 días hasta la observación de raíces transgénicas. Una vez desarrolladas las raíces transgénicas, se procedió a realizar un corte del tallo 1 cm por debajo del sitio donde se generaron las nuevas raíces y las plantas fueron transferidas a cajas de acrílico (de dimensiones de 17 cm x 22 cm x 4,5 cm) conteniendo agar Fahraeus cubierto con papel estéril para evitar la penetración de las raíces en el medio. Las plantas compuestas fueron incubadas durante aproximadamente 7 a 8 días en las cámaras de crecimiento, y luego de este período las mismas fueron inoculadas con 5 ml del cultivo de rizobio o YEM como control.

Transformación de *M. truncatula* mediante *A. rhizogenes* ARqua1

La transformación de *M. truncatula* se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la literatura (Boisson-Dernier et al., 2001). Las cepas de *A. rhizogenes* ARqua1 transformadas con la construcción deseada fueron crecidas y seleccionados en medio LB-agar conteniendo el antibiótico adecuado. Las semillas previamente esterilizadas fueron sincronizadas mediante

dos días a 20 °C en oscuridad y posteriormente germinadas a 25 °C. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se realizó un corte en la radícula a una distancia de 3 mm del extremo inoculando la región seccionada con el cultivo de placa de *A. rhizogenes*. La selección de las plántulas transgénicas se realizó en placas de Petri redondas (9 cm de diámetro) conteniendo medio Fahraeus adicionado con KNO₃ 8 mM y kanamicina 12 mg/ml. Para aumentar la eficiencia de la transformación, las plántulas fueron incubadas durante una semana a 20 °C y posteriormente por dos semanas a 25 °C en las condiciones de crecimiento descritas previamente en esta sección. Las plántulas que desarrollaron raíces transgénicas fueron transferidas en condiciones de esterilidad a cajas de Petri cuadradas (dimensiones 12 cm x 12 cm x 1 cm) conteniendo medio Fahraeus-agar sin KNO₃⁻ y papel estéril sobre el medio. Luego de 7 días de crecimiento a 25 °C, se procedió a realizar la inoculación con 10 ml de un cultivo de *S. meliloti* 1021.

Método de cotransformación con la cepa ARqual de *A. rhizogenes* en raíces de *M. truncatula* para ensayos de colocalización

Para evaluar la colocalización de GFP-RabA2 y ARFA1-RFP se realizó un ensayo de cotransformación en raíces de *M. truncatula*. Las cepas de *A. rhizogenes* ARqual transformadas con las construcciones 35S: GFP-RabA2 y 35S: ARFA1-RFP fueron crecidas en placas con medio LB y los antibióticos kanamicina 100 µg/ml o 200 µg/ml, respectivamente a 28 °C durante dos días. La esterilización de semillas se realizó de acuerdo al protocolo descrito en esta sección. El protocolo de cotransformación consistió en mezclar homogéneamente las cepas ARqual con las fusiones GFP-RabA2 y ARFA1-RFP previo a la transformación de las radículas. Posteriormente se prosiguió con las indicaciones del protocolo de transformación mencionado en esta sección y las raíces fueron analizadas por microscopía confocal 7 días post pasaje a placas cuadradas en las condiciones de crecimiento descritas para *M. truncatula*.

Inoculación de las raíces de *P. vulgaris* con *R. etli* y recolección de tejido de raíz

A partir de estrías de las cepas de *R. etli* crecidas a 28 °C en placas de Petri con medio sólido YEM rojo congo, se inocularon pre inóculos que fueron incubados por 48 h a 28 °C a 250 rpm. Luego, se inocularon erlenmeyers conteniendo medio YEM y los mismos fueron

incubados en las mismas condiciones de crecimiento hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8. En el caso de la cepa *R. etli* CFNX5 DsRed, se adicionó tetraciclina 4 µg/ul para la selección en medio sólido y líquido. Las inoculaciones se realizaron con 5 ml de cultivo por planta y en condiciones de esterilidad. Luego de 24 h post inoculación (HPI), se realizó la extracción de tejido de raíz con nitrógeno líquido, para la posterior extracción de RNA y análisis por RT-qPCR de genes de interés. Por cada cepa utilizada, un mínimo de 5 plantas fue sujeto a un análisis fenotípico de nodulación durante 20 días. El tejido macerado se guardó a -80 °C hasta su utilización.

Inoculación de las raíces de *M. truncatula* con *S. meliloti* y recolección de tejido de raíz

A partir de una estría de *S. meliloti* crecida en medio TY agar con estreptomycin a 400 µg/ml, se inoculó un cultivo líquido de TY con la misma concentración de antibiótico y se incubó a 28 °C y 200 rpm de agitación por 24 h. A partir de este cultivo saturado se inoculó un nuevo medio TY hasta obtener una OD₆₀₀ de 0,8 y posteriormente se realizó una dilución 1:1.000 del mismo. Se utilizaron 10 ml de esta dilución para la inoculación de las plantas transgénicas. Como control se inoculó con agua destilada estéril. A las 24 HPI se colectó tejido con nitrógeno líquido para la obtención de RNA o se realizó un análisis fenotípico de las raíces transgénicas durante aproximadamente 20 días.

Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos

Extracción de RNA

Se maceraron 100 - 200 mg de raíz con N₂ líquido en un mortero y se adicionaron 700 µl de Trizol (Invitrogen). La mezcla fue incubada 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó la mezcla por 15 seg y se incubó 3 min a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 17000 g durante 10 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo *ependorf* y se agregaron 0,5 ml de isopropanol. Luego de mezclar suavemente, se centrifugó a 17000 g durante 10 min a 4 °C y el precipitado fue lavado con etanol 75 %. Una vez seco el precipitado, el mismo fue resuspendido en 50 µl de H₂O seguido de una incubación durante 10 min a 60 °C. EL RNA disuelto fue conservado a -80 °C.

Síntesis de cDNA

La síntesis de primera cadena de cDNA se llevó a cabo a partir de 2 µg de RNA de acuerdo a las instrucciones del proveedor de la enzima transcriptasa reversa MMLV RT (Promega). La primera etapa consistió en un tratamiento con DNAsa durante aproximadamente 1 h a 37 °C de acuerdo a las indicaciones del proveedor (*RQ DNase*, Promega) seguido de una incubación con oligodT₁₅ 5 min a 70 °C seguido del agregado de 200 unidades de la transcriptasa reversa, dNTPs 0,5 mM y *buffer* 1X (Promega), en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción fue incubada 1 h a 42 °C y finalmente a 65 °C por 15 min.

Ensayos de RT- qPCR

Las reacciones de PCR cuantitativo (RT-qPCR) fueron realizadas en un ciclador térmico *CFX96 Real-Time System* (BioRad), utilizando como molde 5 µl de una dilución 1/10 del cDNA sintetizado. EL programa estándar utilizado para las amplificaciones consistió en una primera etapa a 95 °C 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C 23 seg, 52 °C 30 seg y finalmente 72 °C 20 seg. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis de RT-qPCR (tabla 14) fueron diseñados para obtener productos de amplificación con un tamaño aproximado de 200 pb. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, con una concentración de 0.5 µM de cada oligonucleótido, y 10X del *buffer iQ SYBR Green Supermix* (BioRad). Como control de contaminación genómica se realizó una reacción de PCR con cada una de las muestras de RNA previo a la síntesis de cDNA con oligonucleótidos correspondientes al gen de referencia *factor de elongación 1α (EF1α)*. Se realizaron dos replicas técnicas, un control negativo para evaluar contaminación y una curva de calibración con diluciones seriadas del cDNA para cada par de oligonucleótidos utilizados. La posible dimerización de los oligonucleótidos fue analizada con los resultados de las curvas de *melting*. Los valores del ciclo de detección umbral (Ct) de cada gen fueron normalizados con el Ct del gen de referencia EF1α. El análisis de los Ct para cada gen y los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Análisis de la expresión de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} y la fusión traduccional GFP-RabA2 mediante *Western blot*

Extracción de proteínas totales

A partir de tejido de raíz de plantas compuestas individuales pulverizado con nitrógeno líquido se homogenizaron 100 mg de tejido con 200 µl de buffer de siembra 3X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 % p/v, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 0,2 % v/v, azul de bromofenol 0,02 mg/ml). Para la desnaturalización de las proteínas las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min. Luego se precipitaron los restos celulares por centrifugación a 17000 g por 10 min a 4 °C.

Separación de proteínas por SDS-PAGE

Las electroforesis de proteínas se realizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 12 % de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook, 2001) utilizando el Mini PROTEAN System (Biorad). La electroforesis fue realizada en buffer Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %), con una corriente constante de 25 mA durante aproximadamente 1 h.

Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa *Hybond C* utilizando el sistema de transferencia de BioRad y un *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 150 mM pH 8,0, metanol 20 %) con un voltaje constante de 80 V durante 50 min. La presencia de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa y la carga de proteínas en cada calle se evaluó por tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau 0.5 % (p/v) preparada en ácido acético 1 % (v/v). Luego se realizaron lavados con agua para eliminar la solución de Rojo ponceau.

Inmunodetección y revelado por quimioluminiscencia

Las membranas fueron incubadas con una solución bloqueante en buffer PBS-T (las siglas de PBS-T provienen de *Phosphate Buffered Saline with Tween 20*; la composición del buffer 1X es: 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,4) conteniendo leche descremada en polvo 5 % (p/v) durante una noche a 4 °C. Luego de

descartar la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo primario en PBS- T leche 3 % p/v y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min con agitación. Para la inmunodetección de RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} fusionadas al 6XHIS FLAG se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (1:500, Sigma - Aldrich) conjugado a la enzima peroxidasa (HRP). Para la inmunodetección de GFP-RabA2^{Q64L}, GFP-RabA2^{S26N} y GFP-RabA2^{wt} y GFP se utilizó el anticuerpo policlonal anti-GFP JL-8 (1:2500, BD living colors). Posteriormente, se realizaron 5 lavados de la membrana con PBS-T 1X de 5 min cada uno y en el caso de la inmunodetección de GFP se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo 1/3000 conjugado a HRP diluido con PBS-T leche 3 %, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego se realizaron cuatro lavados con PBS-T 1X de 5 min cada uno. Para el revelado de las membranas con las muestras de las fusiones 6HISFLAG-RabA2 y sus versiones mutantes, las mismas fueron incubadas con las soluciones del *kit* de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y expuestas a placas radiográficas durante aproximadamente 1 h siguiendo las instrucciones del proveedor (Amersham Pharmacia Biotech). En el caso del revelado de la fusión GFP-RabA2 y las variantes GFP-RabA2^{Q64L} y GFP-RabA2^{S26N}, se utilizó el sistema de revelado basado en la oxidación del luminol mezclando en volúmenes iguales las soluciones preparadas con luminol (en DMSO) 250 mM, ácido cumárico 90 mM, H₂O₂ 30 vol, buffer Tris HCl 1M pH 8,5. El revelado de quimioluminiscencia fue realizado con un adquisidor de imágenes (UVP BioImaging System).

Caracterización fenotípica de las plantas compuestas de *P. vulgaris* y *M. truncatula*

Eficiencia de transformación cuantificada en *M. truncatula*

El vector pK7WG2D posee como marcador la secuencia de *gfp* bajo la regulación del promotor constitutivo 35S. Para analizar las raíces transgénicas generadas en las plantas compuestas de *M. truncatula* se evaluó la expresión de GFP en las raíces con una lupa LEICA MZFLIII (LEICA Microsystems). La eficiencia de transformación se definió como el porcentaje de plantas compuestas con al menos una raíz transgénica. Los resultados obtenidos corresponden a dos réplicas biológicas y se analizaron en cada experimento al menos 30 plantas por cada construcción utilizada para la transformación.

Análisis del fenotipo de pelo radical y del hilo de infección (IT)

El análisis del fenotipo de IT y de crecimiento polar de los pelos radicales fue realizado mediante microscopía de campo claro y de epifluorescencia con un microscopio invertido IX51 Olympus (*Olympus Corporation*). Para el análisis de la longitud y la densidad de los pelos radicales tanto en *P. vulgaris* como en *M. truncatula* se tomaron fotografías en campo claro con un aumento 20X de la zona media de raíces laterales con una longitud de 1 a 3 cm, en plantas con 8 días de crecimiento en placas de acrílico con medio Agar-Fahraeus, según lo descrito (Blanco y col., 2009). La deformación del pelo radical y la formación de ITs fueron analizadas en *P. vulgaris* en raíces transgénicas laterales de 1 cm de longitud 48 HPI y 7 DPI, respectivamente con la cepa de *R. etli* CFNX5 que expresa la proteína fluorescente DsRed (Zanetti et al., 2010). En *M. truncatula* se evaluó la deformación del pelo radical a las 48 HPI con la cepa de *S. meliloti* 1021 en raíces laterales de aproximadamente 1 cm de longitud. Para el análisis se realizaron dos réplicas biológicas y se evaluaron al menos 10 plantas por construcción. Los datos fueron comparados mediante un análisis estadístico de *t-test* de Student.

Fenotipo de raíz y raíces laterales en plantas compuestas de *M. truncatula*

Para el análisis del fenotipo de raíz en *M. truncatula* se midieron la longitud de las raíces transgénicas y la longitud y densidad de las raíces laterales ubicadas sobre la raíz principal en las plantas compuestas generadas. Para el análisis se realizaron dos réplicas biológicas y se utilizaron al menos 10 plantas por construcción. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el análisis estadístico de *t-test* de Student.

Cinética de nodulación

Para el análisis del fenotipo de nódulos en *P. vulgaris* se evaluaron 10 o más raíces transgénicas provenientes de al menos 10 plantas compuestas por cada condición analizada. En el ensayo de cinética de nodulación, se registró el número de nódulos por raíz a distintos DPI durante un período de 25 días. En el caso del análisis de cinética de nodulación en *M. truncatula*, se cuantificó el número de nódulos por raíz a los 5, 10, 15 y 20 DPI desarrollados en raíces transgénicas identificadas por la fluorescencia de GFP. Para evaluar el fenotipo se utilizaron un mínimo de 12 raíces independientes provenientes de 7 plantas por cada

construcción analizada. El análisis del fenotipo de nodulación fue realizado con dos réplicas biológicas en ambos ensayos.

Diámetro de nódulos

Los nódulos desarrollados en *P. vulgaris* a 18 DPI con *R. etli* SC15 o 55N1 fueron fotografiados con la lupa LEICA MZFLIII (LEICA Microsystems) con un aumento 2X. Las fotografías fueron registradas con una escala de 1 mm y el diámetro fue cuantificado con el programa *Photoshop* (Adobe Systems Incorporated). El análisis estadístico se realizó con el *t-test* de *Student* de dos colas y se midieron aproximadamente 100 nódulos por cada condición analizada.

Ensayos de coinoculación y análisis de polimorfismo del gen *nodC*

Para el ensayo de competencia de las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1, se generaron plantas compuestas GFP GUS, RabA2^{Q64L} y RabA2^{S26N} que fueron transferidas a potes con vermiculita conteniendo medio Fahraeus sin KN₃⁻ e incubadas por 9 días en domos de plástico de acuerdo al protocolo estandarizado para ensayos de coinoculación en *P. vulgaris* en cámara de crecimiento (Aguilar et al., 2004). Los cultivos de las cepas SC15 y 55N1 se incubaron a 28 °C a 250 rpm hasta obtener una OD₆₀₀ de 0,8 y posteriormente se mezclaron en cantidades iguales. Se inocularon con 5 ml de la mezcla de cultivos 10 plantas compuestas por cada construcción analizada y posteriormente las plantas fueron incubadas en los domos de plástico en la cámara de crecimiento. Cuatro semanas después de la coinoculación, se cosecharon aproximadamente 100 nódulos provenientes de siete plantas compuestas independientes para cada construcción y se procesaron para la extracción de DNA bacteriano. La primera etapa del protocolo consistió en la recuperación de bacterias a partir de nódulos. El protocolo de recuperación de bacterias a partir de nódulos de *P. vulgaris* consistió en una primera etapa de esterilización con alcohol 96% por 30 seg, una incubación en H₂O₂ 30 vol por 6 min seguido de 6 lavados con H₂O estéril. Los nódulos fueron macerados y se adicionó 5 µl de H₂O estéril. La solución de bacterias se sembró por estría en una placa de Petri con medio YEM-rojo congo-agar (Zanetti et al., 2010). Luego de la incubación durante 3 días a 28 °C, a partir de cada estría realizada se tomó una muestra de bacterias y se resuspendió en 200 µl de NaCl 1M. Luego de resuspender las bacterias, se centrifugó a 17300 g por 2 min. Se procedió a un lavado con 200 µl de H₂O estéril, y centrifugación a 17000 g por 2 min. Se

resuspendió el precipitado en 200 µl de resina Chelex 6 % p/v (BioRad). Las muestras fueron posteriormente incubadas a 56 °C por 8 min seguido de una incubación a 99 °C por 10 min, centrifugadas a 17300 g por 2 min y el sobrenadante fue utilizado para el análisis del polimorfismo *nodC*. Finalmente, el DNA se sometió a un análisis polimórfico del alelo *nodC* mediante amplificación por PCR y análisis de restricción con *Hinf* I según el protocolo descrito (Aguilar et al., 2004). Los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la tabla 14.

Microscopía confocal y electrónica de transmisión (TEM)

El tejido de nódulo de *P. vulgaris* se procesó como se describió previamente (Zanetti et al., 2010). Secciones de 1-2 mm se tiñeron con azul de toluidina 0,04 % y se examinaron con un microscopio invertido Olympus IX51 (Olympus Corporation). Secciones ultrafinas de 70 nm se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se analizaron con el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL) (servicio provisto por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata). La microscopía confocal realizada con muestras de raíz de *P. vulgaris* y *M. truncatula* para el análisis de localización subcelular y la observación de ITs fue realizada con un microscopio confocal Leica (SP5) con un objetivo de inmersión 63X en segmentos de raíz de tipo salvaje y raíces transgénicas. Los espectros de emisión utilizados para detectar las fluorescencias fueron los siguientes: GFP (498nm - 550nm), mRFP (604nm - 701nm) y DsRed (578nm - 626nm). Las imágenes y videos fueron capturados por la cámara del microscopio Olympus FV300 (servicio provisto por la plataforma de microscopía avanzada PMA-FCEN, de la Universidad Nacional de La Plata). Ambos servicios son regulados por el servicio de microscopía Nacional (<http://turnos.microscopia.mincyt.gob.ar/sistema/#>)

Bioinformática

Análisis informático de genes coexpresados con RabA2 en *M. truncatula*

La secuencia de aminoácidos de RabA2 fue utilizada en un análisis de BLASTn en la base de datos de *M. truncatula* y el gen con mayor identidad de secuencia correspondió al identificador de Affymetrix Mtr.8716.1.S1_at correspondiente al ortólogo de *RabA2* de *M. truncatula* (Medtr3g069510). Posteriormente se realizó con la secuencia de Mtr.8716.1.S1_at

un análisis en la base de datos *Gene Expression Atlas* de *M. truncatula* (<http://mtgea.noble.org/v3/index.php>), la cual contiene datos de expresión de distintos tejidos y distintos estadios de la nodulación provenientes de microarreglos de *Affymetrix Medicago Gene Chip* (Benedito et al., 2008). El análisis se realizó para identificar genes relacionados con *RabA2* en *M. truncatula* con un índice de correlación Pearson superior a 0,9. La clasificación de los genes coexpresados con *RabA2* en *M. truncatula* fue realizada en base a la anotación funcional obtenida del análisis de correlación.

Análisis filogenético de los miembros de ARFA1 en *P. vulgaris* y *M. truncatula*

El análisis filogenético para los distintos miembros de ARFA1 de *P. vulgaris*, *A. thaliana* y *M. truncatula* fue realizado con MEGA6 a partir de los alineamientos obtenidos con ClustalW. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método *Neighbor-joining* y los números representan los valores de *bootstrap* obtenidos de 10000 repeticiones. Los árboles filogenéticos fueron diagramados en una escala definida por las distancias evolutivas con el programa MEGA6. Las distancias evolutivas se consideran como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El alineamiento múltiple de la familia ARFA1 de *M. truncatula* fue procesado con el programa ClustalW. Los aminoácidos resaltados en negro corresponden a aminoácidos idénticos y los resaltados en gris a sustituciones de aminoácidos conservados.

Análisis del transcriptoma de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con distintas cepas de *R. etli* por RNAseq

Material vegetal, diseño experimental y secuenciación masiva

Las muestras de tejido de raíz utilizadas para RNAseq corresponden a plantas salvajes de *P. vulgaris* 24 HPI con las cepas CE3, CE343, CE338, CE109 y NodA⁻ de *R. etli*. Estas cepas poseen distinto grado de eficiencia de nodulación y fenotipos específicos descritos previamente en la sección Cepas Bacterianas. Como control se utilizó para la inoculación medio YEM. Los cultivos de rizobios fueron crecidos de acuerdo al protocolo descrito en esta sección. Para obtener el material vegetal, se colocaron semillas germinadas de *P. vulgaris* en placas de acrílico conteniendo medio Fahraeus-agar sin KNO₃⁻. Las cajas fueron incubadas durante 8 días en la cámara de cultivo y luego se inocularon 5 plantas con 5 ml del cultivo de *R. etli* por cada cepa analizada. A las 24 HPI se recolectó y maceró con nitrógeno

líquido el tejido de raíz correspondiente a la zona II por cada tratamiento de inoculación. La zona corresponde a la zona de la raíz ubicada 2 cm a partir del ápice de la raíz y 2 cm por debajo de la base del tallo y es susceptible de la infección por el rizobio. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA de acuerdo al protocolo descrito en esta sección y se procedió al análisis de genes de nodulación por RT-qPCR para analizar las respuestas de nodulinas 24 HPI con las cepas de *R. etli* CE3 y sus versiones mutantes. Se realizaron dos réplicas biológicas.

Para la construcción de las muestras de cDNA para RNAseq se utilizaron 3,5 µg de RNA por cada condición correspondiente al tejido de raíz de las plantas inoculadas utilizando el protocolo suministrado con el *TruSeq RNA Sample Preparation kit v2* de Illumina. El protocolo consta de una primera etapa en la cual el mRNA es aislado a partir de RNA total utilizando bolillas magnéticas conjugadas a oligo-dT y luego fragmentado utilizando cationes divalentes, generando fragmentos de aproximadamente 200 pb. EL RNA fragmentado es transcrito a cDNA utilizando hexanucleótidos con secuencias al azar y la transcriptasa reversa *Superscript II* (Invitrogen). La segunda etapa consiste en la reparación de extremos para generar extremos romos seguidos de una ligación de adenina en el extremo 3' y de una reacción de ligación con oligonucleótidos adaptadores con timinas en sus extremos, generando fragmentos de cDNA de 200 pb aproximadamente. Finalmente, el protocolo requiere de una etapa de amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA. Las etapas de purificación del cDNA, la ligación de adaptadores, y la amplificación de PCR requieren de un proceso de purificación en el que se utilizan bolillas *AMPure XP beads* (Beckman Coulter Genomics). El sistema de purificación de AMPure XP PCR consiste en una tecnología de fase sólida paramagnética para la automatización de la purificación de amplicones o DNA en ensayos de gran escala. Este sistema utiliza un *buffer* optimizado para unir selectivamente DNA de 100 pb o mayor tamaño a las bolillas paramagnéticas. El exceso de oligonucleótidos, nucleótidos, sales y enzimas se remueven en los pasos de lavados. El análisis de calidad de las bibliotecas se llevó a cabo con el equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*, usando el *chip Agilent DNA-1000* de acuerdo a las indicaciones provistas en el manual. Cada biblioteca de cDNA fue normalizada a una concentración final de 10 mM teniendo en cuenta los resultados provistos por el equipo *Bioanalyzer*. Finalmente, las bibliotecas fueron divididas en grupos para ser secuenciadas en el equipo *Illumina HiSeq2500* (servicio provisto por la Universidad de California, Riverside) y se obtuvieron un número promedio de 60

millones de lecturas por cada muestra analizada, y una longitud de las lecturas de 50 bases (*simple end*).

Procesamiento y análisis de la información de la secuenciación

El análisis informático fue llevado a cabo a través de la interfase GALAXY (Blankenberg et al., 2010b; Goecks et al., 2010; Blankenberg and Hillman-Jackson, 2014). GALAXY es una plataforma web que permite realizar diversos análisis informáticos sin requerir previos conocimientos en programación. Las lecturas obtenidas del centro de secuenciación poseen un formato fastq y corresponden a lecturas denominadas *simple end* porque solo fueron secuenciadas en un sentido. El archivo fastq corresponde a un archivo que contiene las secuencias, pero además posee información de la calidad de las lecturas por cada base. La primera etapa del análisis requirió convertir el formato fastq de las secuencias al formato fastq Sanger con la opción *Groomer* de GALAXY permitiendo obtener un formato estándar fastq compatible con el software de análisis (Blankenberg et al., 2010a). Esta opción se encuentra en *NGS:QC Manipulation > FastQ Groomer*. Luego se procedió a analizar la calidad de las lecturas con la opción *NGS:QC and Manipulation > FASTQ QC > Fastqc* para cada uno de los archivos fastq. Esta herramienta provee un reporte HTML con información que permite evaluar la calidad de las lecturas con un *score* por base (figura suplementaria 1). El alineamiento de las lecturas de RNA-Seq alineadas con el genoma de referencia, *P. vulgaris* (genoma *Phaseolus vulgaris* v1.0, fuente DOE-JGI, USDA-NIFA, ARRA), se realizó con el programa *TopHat2* (Daehwan y col., 2013). Esta herramienta se encuentra en la opción *NGS:RNAseq>TopHat2* y la misma utiliza el programa *Bowtie2* (Langmead and Salzberg, 2012) y además permite identificar sitios de *splicing* entre los exones. Luego de seleccionar el genoma de referencia en la herramienta TopHat2, se seleccionó la opción *Full Parameters* y se modificaron los siguientes parámetros recomendables para genomas de plantas:

- > *minimum intron length: 60*
- > *Maximum intron length: 6000*
- > *Allow indel search: YES*
- > *Minimum intron length that may be found during split-segment (default) search: 45*
- > *Maximum intron length that may be found during split-segment (default) search: 5000*
- > *Use own junction: YES*

> *Use gene annotation model: YES*> *gene model gff3 archive*

> *Use coverage search: YES*

Los archivos generados tienen una extensión BAM, que luego son analizados con el paquete análisis *Cufflinks* que consta de tres herramientas de análisis: *Cufflinks*, *cuffmerge* y *cuffdiff* (Trapnell y col 2009; Trapnell y col., 2012). La herramienta *Cufflinks* permitió ensamblar los transcritos para cada condición y se encuentra en la opción NGS_RNAseq > *Cufflinks*. Los parámetros modificados del *default* fueron (para un mejor análisis estadístico):

> *reference anotation: YES*

> *Perform quartile normalization: YES*

> *Perform BIAS correction: YES*

> *Use multi-read correct: YES*

> *Use effective length correction: YES*

Seguidamente, los transcritos ensamblados fueron combinados con la opción NGS:RNAseq > *CuffMerge*. Hasta esta etapa del análisis bioinformático, los archivos fastq de las réplicas biológicas fueron analizados independientemente. Sin embargo, en la herramienta *CuffDiff*, los archivos resultantes de *TopHat2* para las réplicas biológicas fueron agrupados. Finalmente, los archivos con los alineamientos de *TopHat2* y el archivo de todos los transcritos ensamblados obtenido en *CuffMerge* fueron analizados con *Cuffdiff* para detectar transcritos con expresión diferencial. *Cuffdiff* está ubicado en NGS_RNAseq > *CuffDiff*. Los parámetros modificados fueron:

> *Library dispertion method: Quartile*

> *Multi read correct: YES*

> *Perform Bias Correction: YES*

> *Use Muli read correct: YES*

Cuffdiff genera varios archivos, entre ellos archivos que indican la abundancia de los transcritos a nivel del gen e isoformas. Esta herramienta permite estimar los valores de FPKM (del inglés *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*, Fragmentos por Kilobase de transcripto por millón de lecuras alineadas) para cada transcripto para cada una de las muestras con las anotaciones permitiendo encontrar diferencias significativas en la expresión de transcritos, *splicing* y el uso de promotores. Los archivos de

Cuffdiff fueron descargados y analizados con CummeRbund en R versión 3.0.3 para Windows 64 bits (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/>). CummeRbund implementa numerosas funciones gráficas utilizadas para la visualización de datos. Posteriormente se utilizó este software para analizar la reproducibilidad de las réplicas biológicas, la calidad de las muestras y el análisis estadístico de los genes diferenciales.

Clustering de los genes diferenciales en las muestras de RNAseq correspondientes a tejido de raíz 24 HPI con las cepas de *R. etli* CE3, CE343, CE338, NodA- y el control YEM

El análisis de *clustering* o agrupación de los valores de FPKM de RNAseq de las distintas muestras corresponde a los valores de FPKM de los genes diferenciales obtenidos por *Cuffdiff*. El algoritmo seleccionado fue *k-means* y el análisis fue realizado con el software bioinformático GENESIS (Sturn y col., 2002 <http://genome.tugraz.at>). Para evaluar los procesos biológicos representativos en los distintos clusters se realizó una clasificación funcional en base a la categorización del *Gen Ontology* (GO) realizada con el software Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>).

Secuencias

Secuencia de cDNA de *RabA2* de *P. vulgaris* (Phvul.011G061100)

```
ATGACGCATCGAGTGGACCACGAGTATGACTATCTGTTCAAGATCGTTTTGATCGGAGACTCAGGTGTTGGCAA
TCCAACATCCTTTCAAGTTCACTCGAAACGAGTTCTGCTTGGAGTCCAAATCCACTATCGGAGTCGAGTTCGCC
ACCAGGACTCTTCAGGTAGAGGGGAAGACTGTGAAAGCACAGATCTGGGACACAGCAGGTGAGGAGCGGTACCGT
GCCATTACCAGTGCTTATTATAGAGGAGCTGTAGGTGCTTTACTTGTATATGACATAACTAAGAGACAAACCTTT
GACAAATGTCCAAAGGTGGTTGCGTGAGCTGAGGGACCATGCGGATTCTAATATAGTTATCATGATGGCTGGAAAT
AAATCTGATTTGAGCCATCTAAGAGCGGTTTACGAGGACGATGGTCAAACCTTGGCGGAGAGGGAAGGTCTGTCG
TTTCTTGAGACATCTGCACTGGAGGCAACCAACATTGAGAAGGCATTCCAAACATTTTGACAGAGATTTATCAT
ATTGTTAGCAAAAAGGCACTCGCAGCTCAGGAAGCAGGTGTTGGTACCACACTTCCTGGTCAAGGTACCACCATC
AATGTTGGGGATGCATCTGGGAATACAAAGAGAGGCTGCTGCTCCACTTAG
```

Secuencia de cDNA del ortólogo de RabA2 de *M. truncatula*

ATGGGGTTAACATTACAAAAGCTGTTTCAGTCGGTTATTCGCGAAGAAGGAAATGCGAATTCTGATGGTTGGTCTC
 GATGCGGCTGGTAAGACCACCATCCTTTACAAGCTCAAGCTTGGAGAGATCGTCACCACCATCCCTACCATTGGG
 TCAATGTTGAGACTGTGGAGTACAAGAACATTAGCTTCACCGTTTGGGATGTTGGAGGCCAAGACAAGATTTCGT
 CCACTGTGGAGGCACTACTTCCAGAACAACCTCAGGGTCTTATATTTGTCGTAGACAGCAATGACAGGGATAGAGTT
 GTTGGAGCCAGAGATGAGTTACATAGGATGTTGAATGAGGATGAACTGAGAGATGCAGTTTTGCTTGTGTTTCGCC
 AACAAACAAGATCTTCCAAATGCAATGAATGCTGCCGAAATTACTGACAAGTTGGGTCTTCACTCGCTGAGACAG
 CGCCACTGGTACATCCAGAGCACCTGTGCAACCTCTGGGGAGGGTCTCTATGAAGGTTTGGACTGGCTTCCAAC
 AACATAGCCAACAAGAAAAGCTTAATGCTTATCGGGAGTATTGTGGATTGGTGATTCTGGATGCAGGGAGGAAA
 ATATTATCTATAGAAATTTGTTTCATGGGCTTTGTAATACTTCTGCGCCTTCTATTGGTTTTCGATGCAATGCC
 ATAGTTGTAGTTGAGATACAATTAATATGCCTCAAGTCTGCTTTATAGTTTTATTTTCGGTTCATTCTTCACCC
 TTCTCTCTCTGTCTCTGTCTCTGCGATTTCTGTACATCAACTTTTCTTCTTCCAAGTGAAGGAGAAAATGGGG
 TTAACATTACGAAGCTGTTTCAGTCGGTTATTTGCGAAGAAGGAAATGCGAATTCTGATGGTTGGTCTCGATGCA
 GCTGGTAAGACCACCATTCTCTACAAGCTCAAGCTTGGAGAAATTTGTCACCACTATCCCTACTATCGGGTTCAAT
 GTGGAGACTGTGGAATACAAGAACATTAGCTTCACTGTTTGGGATGTCCGAGGCCAGGACAAGATTCGTCCTTG
 TGGAGGCACTACTCCAGAACAACCTCAGGGTCTTATATTTGTTGTTGACAGCAATGACAGGGATAGAGTTGTTGAG
 GCCAGAGATGAGCTACATAGGATGTTGAATGAGGATGAACTGAGAGATGCAGTGTGCTTGTGTTTGCCAACAAA
 CAAGATCTTCCCAATGCAATGAATGCAGCTGAGATTAAGTACTGACAAGCTGGGTCTCCACTCTCTCAGACAGCCAC
 TGGTACATACAGAGCACTTGTGCCACCTCTGGGGAGGGTCTTTATGAAGGTCTGGACTGGCTTCCAACAACATT
 GCCAATAAGGCATAA

Secuencias de aminoácidos de ARFA1 de las especies *P. vulgaris*, *M. truncatula* y *A. thaliana*

Subfamilia *A. thaliana* AtARFA1

>AtARFA1a

MGLSFAKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFN VETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
 PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
 RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIAGKA

>AtARFA1b

MGLNFTKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFN VETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
 PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
 RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIATKVN N LNIPF*

>AtARFA1c

MGLSFGKLF SRLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFN VETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
 PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
 RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASKA*

>AtARFA1d

MGLSFAKLFSR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIAGKA*

>AtARFA1e

MGLSFGKLF SKLFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIANKA*

>AtARFA1f

MGLSFAKLFSR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASKA *

Subfamilia *M. truncatula* AtARFA1

>MtArfA1e (Medtr1g106180.1)

MGLSFTKLF SR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIANKA*

>MtArfA1c (Medtr6g005820.1)

MGLTFTKLF SR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKI
RPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLR
QRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASKA*

>MtArfA1a (Medtr5g035430.1)

MGLTFTKLF SR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIANKA*

>MtArfA1b (Medtr7g109960.1)

MGLSFTKLF SR LFAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLG EIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDEL RDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLSNNIASKVNKEKIFSETLLSYSFVMGCMKFNRV*

>MtArfA1d (Medtr5g016540.1)

MGLTVSRIMRLFYAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNVSFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRERILEARDELHRMLSEDELRDATLLVFANKQDLPNALS VSEITDKLGLHSLRQ
RRWYIQSTCATSGQGLYEGLDWLS SNI SNKIR*

Subfamilia *P. vulgaris* ARFA1

>Phvul.007G211700

MGLSFGKIFSR LCAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKI
RPLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEAKDELHRMLNEDELRD AVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDRLGLNSLR
QRHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLS SNI SSKTSFK*

>Phvul.001G215400.1

MGLSFTKLF SRLF A K KEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDELRD AVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLS SNI ANKA*

>Phvul.002G015400

MGLTVSR L MRLFYARKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNVSFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRERILESRDELHRMLSEDELRDATV L VFANKQDLPNALSVAEITDKLGLHSLRL
RRWYIQPTCATSGQGLYEGLDWLS S S H I SNKTR*

>Phvul.004G011900.1

MGLSFTKLF SRLF A K KEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDELREAVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLEWLS S NI ASKA*

>Phvul.006G122200.1

MGLSFGKIFSR LCAKKEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEAKDELHRMLNEDELRD AVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDRLGLNSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLS S NI SSKTSFK*

>Phvul.003G061400.1

MGLTFTKLF SRLF A K KEMRILMVGLDAAGKTTILYK LKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIR
PLWRHYFQNTQGLIFVVD S NDRDRVVEARDELHRMLNEDELRD AVLLVFANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRQ
RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWLS S NI ANKA*

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E.** (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13548-13553.
- Aguilar, O.M., Lopez, M.V., Riccillo, P.M., Gonzalez, R.A., Pagano, M., Grasso, D.H., Puhler, A., and Favelukes, G.** (1998). Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3520-3524.
- Aharoni, A., De Vos, C.H.R., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N.M., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* **28**, 319-332.
- Amarger, N., Macheret, V., and Laguerre, G.** (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 996-1006.
- Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, 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.
- Araújo, S., Duque, A., Santos, D., and Fevereiro, M.** (2004). An Efficient Transformation Method to Regenerate a High Number of Transgenic Plants Using a New Embryogenic Line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *The Plant Cell* **78**, 123-131.
- Arrighi, J.-F., Godfroy, O., de Billy, F., Saurat, O., Jauneau, A., and Gough, C.** (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 9817-9822.
- 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 [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology* **142**, 265-279.
- Asamizu, E., Shimoda, Y., Kouchi, H., Tabata, S., and Sato, S.** (2008). A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **147**, 2030-2040.
- Atkinson, E.M., Palcic, M.M., Hindsgaul, O., and Long, S.R.** (1994). Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 8418-8422.
- Axtell, M.J.** (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 137-159.
- Battaglia, M., and Covarrubias, A.A.** (2013). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science* **4**, 4-190.
- Battaglia, M., Ripodas, C., Clúa, J., Baudin, M., Aguilar, O.M., Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2014). A Nuclear Factor Y Interacting Protein of the GRAS Family Is Required for Nodule Organogenesis, Infection Thread Progression, and Lateral Root Growth. *Plant Physiology* **164**, 1430-1442.
- Benaben, V., Duc, G., Lefebvre, V., and Huguet, T.** (1995). TE7, An Inefficient Symbiotic Mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiology* **107**, 53-62.
- Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andrianakaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K.** (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **55**, 504-513.
- Bento, C.F., Puri, C., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C.** (2013). The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *Journal of Cell Science* **126**, 1059-1069.
- Bernier, F., and Berna, A.** (2001). Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 545-554.
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A.** (2004). Ethylene Response Factor 1 Mediates Arabidopsis Resistance to the Soilborne Fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 763-770.

- Blair, M.W., Iriarte, G., and Beebe, S.** (2006). QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theor Appl Genet* **112**, 1149-1163.
- Blanco, F.A., Meschini, E.P., Zanetti, M.E., and Aguilar, O.M.** (2009). A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association. *The Plant Cell* **21**, 2797-2810.
- Blankenberg, D., and Hillman-Jackson, J.** (2014). Analysis of Next-Generation Sequencing Data Using Galaxy. In *Stem Cell Transcriptional Networks*, B.L. Kidder, ed (Springer New York), pp. 21-43.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., and Team, t.G.** (2010a). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* **26**, 1783-1785.
- Blankenberg, D., Kuster, G.V., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., and Taylor, J.** (2010b). Galaxy: A Web-Based Genome Analysis Tool for Experimentalists. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 89:19.10:19.10.81–19.10.21.
- Böhlenius, H., Mørch, S.M., Godfrey, D., Nielsen, M.E., and Thordal-Christensen, H.** (2010). The Multivesicular Body-Localized GTPase ARFA1b/1c Is Important for Callose Deposition and ROR2 Syntaxin-Dependent Preinvasive Basal Defense in Barley. *The Plant Cell* **22**, 3831-3844.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 695-700.
- Bond, J.E., and Gresshoff, P.M.** (1993). Soybean transformation to study molecular physiology. In *Plant Responses to the Environment*, pp. 25-44.
- Boscari, A., del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.-L., Delledonne, M., and Puppo, A.** (2013). Expression Dynamics of the *Medicago truncatula* Transcriptome during the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*: Which Role for Nitric Oxide? *Plant Physiology* **161**, 425-439.
- 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*. *The Plant Journal* **54**, 876-887.
- Brewin, N.** (2004). Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**, 293–316.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J.** (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55-128.
- Butt, H., Graner, S., and Luschig, C.** (2014). Expression analysis of Arabidopsis XH/XS-domain proteins indicates overlapping and distinct functions for members of this gene family. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1217-1227.
- Capela, D., Carrere, S., and Batut, J.** (2005). Transcriptome-Based Identification of the *Sinorhizobium meliloti* NodD1 Regulon. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4910-4913.
- Cardenas, L., Vidali, L., Domnguez, J., Prez, H., Snchez, F., Hepler, P.K., and Quinto, C.** (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to rhizobium etli nodulation signals. *Plant Physiology* **116**, 871-877.
- Caretti, G., Salsi, V., Vecchi, C., Imbriano, C., and Mantovani, R.** (2003). Dynamic Recruitment of NF-Y and Histone Acetyltransferases on Cell-cycle Promoters. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 30435-30440.
- Catoira, R.** (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell* **12**, 1647-1665.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., and Terzaghi, W.** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133-1144.

- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M.** (2008). Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *The Plant Cell* **20**, 3467-3479.
- Chiasson, D.M., Loughlin, P.C., Mazurkiewicz, D., Mohammadidehcheshmeh, M., Fedorova, E.E., Okamoto, M., McLean, E., Glass, A.D.M., Smith, S.E., Bisseling, T., Tyerman, S.D., Day, D.A., and Kaiser, B.N.** (2014). Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH₄⁺ transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 4814-4819.
- Cho, H.-T., and Cosgrove, D.J.** (2000). Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9783-9788.
- Chow, C.M., Neto, H., Foucart, C., and Moore, I.** (2008). Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-golgi endosomal membrane domain in Arabidopsis that contributes substantially to the cell plate. *The Plant Cell* **20**, 101-123.
- Christie, J.M.** (2007). Phototropin Blue-Light Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45.
- Cole, R.A., and Fowler, J.E.** (2006). Polarized growth: maintaining focus on the tip. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 579-588.
- 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 & Development* **20**, 3084-3088.
- Cook, D.R.** (1999). Medicago truncatula — a model in the making!: Commentary. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 301-304.
- 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.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- D'Antuono, A.L., Ott, T., Krusell, L., Voroshilova, V., Ugalde, R.A., Udvardi, M., and Lepek, V.C.** (2007). Defects in Rhizobial Cyclic Glucan and Lipopolysaccharide Synthesis Alter Legume Gene Expression During Nodule Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 50-60.
- D'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., and Ratet, P.** (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *The Plant Journal* **34**, 95-106.
- Dalla Via, V., Rípodas, C., Clúa, J., Narduzzi, C., Reynoso, M., Aguilar, M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.** (2013). Common Bean as an Emerging Model Grain Legume. In *Legumes: Types, Nutritional Composition and Health Benefits*, pp. 1-11.
- Davies, G., and Henrissat, B.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe, M., and Pankratz, S.H.** (1984). Specific phases of root hair attachment in the Rhizobium trifolii-clover symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 1140-1150.
- de Graaf, B.H., Cheung, A.Y., Andreyeva, T., Levasseur, K., Kieliszewski, M., and Wu, H.M.** (2005). Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *The Plant Cell* **17**, 2564-2579.
- Dénarié, J., and Cullimore, J.** (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**, 951-954.
- Devaiah, B.N., Nagarajan, V.K., and Raghothama, K.G.** (2007). Phosphate Homeostasis and Root Development in Arabidopsis Are Synchronized by the Zinc Finger Transcription Factor ZAT6. *Plant Physiology* **145**, 147-159.
- Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N.** (1996). The SCARECROW Gene

- Regulates an Asymmetric Cell Division That Is Essential for Generating the Radial Organization of the Arabidopsis Root. *Cell* **86**, 423-433.
- Diaz, L.M., and Blair, M.W.** (2006). Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theor Appl Genet* **114**, 143-154.
- Diebold, R., and Noel, K.D.** (1989). Rhizobium leguminosarum exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. *Journal of Bacteriology* **171**, 4821-4830.
- Donà, M., Confalonieri, M., Minio, A., Biggiogera, M., Buttafava, A., Raimondi, E., Delledonne, M., Ventura, L., Sabatini, M.E., Macovei, A., Giraffa, G., Carbonera, D., and Balestrazzi, A.** (2013). RNA-Seq analysis discloses early senescence and nucleolar dysfunction triggered by Tdp1 α depletion in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1941-1951.
- Downie, J.A.** (1998). Functions of Rhizobial Nodulation Genes. In *The Rhizobiaceae*, H. Spaink, A. Kondorosi, and P.J. Hooykaas, eds (Springer Netherlands), pp. 387-402.
- Downie, J.A.** (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 150-170.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **15**, 573-581.
- Dubos, C., Le Gourrierc, J., Baudry, A., Huet, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Alboresi, A., Weisshaar, B., and Lepiniec, L.** (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **55**, 940-953.
- E Marin, L.N., A Quesada, M Gonneau, B Sotta, P Hugueney, A Frey, and A Marion-Poll.** (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana. *EMBO Journal* **15**, 2331-2342.
- East, M.P., and Kahn, R.A.** (2011). Models for the functions of Arf GAPs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 3-9.
- 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.
- Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A.C., Kent Peters, N., and Noel, K.D.** (1994). Inhibition of Rhizobium etli Polysaccharide Mutants by *Phaseolus vulgaris* Root Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3315-3322.
- El Yahyaoui, F., Küster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Pühler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernié, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., and Gamas, P.** (2004). Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. *Plant Physiology* **136**, 3159-3176.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., and Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Englbrecht, C., Schoof, H., and Böhm, S.** (2004). Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics* **5**, 39.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Diaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., Sanchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P.M., and Sanchez, F.** (2006). Agrobacterium rhizogenes transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1385-1393.
- Ewing B, G.P.** (1989a). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8**, 186-194.
- Ewing B, H.L., Wendl MC, Green P. .** (1989b). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**, 175-185
- 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 Physiology* **116**, 53-68.

- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M.** (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 61-76.
- Feys, B.J., and Parker, J.E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**, 449-455.
- Fode, B., Siemsen, T., Thurow, C., Weigel, R., and Gatz, C.** (2008). The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant Cell* **20**, 3122-3135.
- Fournier, J., Timmers, A.C.J., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G.** (2008). Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiology* **148**, 1985-1995.
- Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 280-300.
- Gepts, P.** (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Econ. Bot.* **44**, 28-38.
- Gepts, P.** (1998). Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hort. Science* **33**, 1124-1130.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K., and Bliss, F.A.** (1986). Phaseolin-protein Variability in Wild Forms and Landraces of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for Multiple Centers of Domestication. *Econ Bot* **40**, 451-468.
- Gepts, P.A.B., F. A.** (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. Europe and Africa. *Econ. Bot.* **42** 86-104.
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., and Holsters, M.** (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 2669-2673.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., and Walker, G.C.** (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413-441.
- Giraud, E.** (2007). Symbiose rhizobium/ légumineuse : un nouveau sésame. *Med Sci (Paris)* **23**, 663-666.
- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis — 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 301-308.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., and Team, T.G.** (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology* **11**, R86.
- Graham, P.H., and Vance, C.P.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131**, 872-877.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D., and Novick, P.** (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 11821-11827.
- 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. *The Plant Cell* **22**, 2509-2526.
- Gruber, N., and Galloway, J.N.** (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**, 293-296.
- Guinel, F.C., and Geil, R.D.** (2002). A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian Journal of Botany* **80**, 695-720.
- Hadri, A.-E., and Bisseling, T.** (1998). Responses of the Plant to Nod Factors. In *The Rhizobiaceae*, H. Spink, A. Kondrosi, and P.J. Hooykaas, eds (Springer Netherlands), pp. 403-416.
- Hakoyama, T., Oi, R., Hazuma, K., Suga, E., Adachi, Y., Kobayashi, M., Akai, R., Sato, S., Fukai, E., Tabata, S., Shibata, S., Wu, G.-J., Hase, Y., Tanaka, A., Kawaguchi, M., Kouchi, H., Umehara, Y., and Sukanuma, N.** (2012). The SNARE Protein SYP71 Expressed in Vascular Tissues Is Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Nodules. *Plant Physiology* **160**, 897-905.

- Hayashi, S., Reid, D.E., Lorenc, M.T., Stiller, J., Edwards, D., Gresshoff, P.M., and Ferguson, B.J.** (2012). Transient Nod factor-dependent gene expression in the nodulation-competent zone of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Plant Biotechnology Journal* **10**, 995-1010.
- He, J., Benedito, V., Wang, M., Murray, J., Zhao, P., Tang, Y., and Udvardi, M.** (2009). The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**, 441.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A.** (2006). Lotus japonicus Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume. *Plant Physiology* **142**, 1739-1750.
- Heidstra, R., Yang, W.C., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A.M., Kammen van, A., and Bisseling, T.** (1997). Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium-legume* interaction. *Development* **124**, 1781-1787.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P.C.** (2003). The Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 735-747.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T., and Benfey, P.N.** (2000). The *SHORT-ROOT* Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. *Cell* **101**, 555-567.
- Hepler, P.K., Vidali, L., and Cheung, A.Y.** (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 159-187.
- Hernandez-Lucas, I., Segovia, L., Martinez-Romero, E., and Pueppke, S.G.** (1995). Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2775-2779.
- Hickson, G.R.X., Matheson, J., Riggs, B., Maier, V.H., Fielding, A.B., Prekeris, R., Sullivan, W., Barr, F.A., and Gould, G.W.** (2003). Arfophilins Are Dual Arf/Rab 11 Binding Proteins That Regulate Recycling Endosome Distribution and Are Related to *Drosophila* Nuclear Fallout. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 2908-2920.
- 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*. *The Plant Cell* **21**, 545-557.
- Høgslund, 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., Schausser, L., Weiller, G.F., Udvardi, M.K., and Stougaard, J.** (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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 1345-1358.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Blecker, A.B., Ecker, J.R., and Meyerowitz, E.M.** (1998). EIN4 and ERS2 Are Members of the Putative Ethylene Receptor Gene Family in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1321-1332.
- Ishida, K., Niwa, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2009). A Genome-Wide Compilation of the Two-Component Systems in *Lotus japonicus*. *DNA Research* **16**, 237-247.
- Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., and Bisseling, T.** (2012). *Rhizobium-legume* symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8316-8321.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F.** (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **7**, 106-111.
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., and Skriver, K.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–

- function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* **426**, 183-196.
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., and Luo, J.** (2014). PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research* **42**, D1182-D1187.
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J.** (1993). Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 625-629.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C.** (2007a). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 619-633.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C.** (2007b). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat Rev Micro* **5**, 619-633.
- Jones, M.A., Shen, J.J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z., and Grierson, C.S.** (2002). The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *The Plant Cell* **14**, 763-776.
- 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. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **14**, 737-748.
- Kahn, R.A., Der, C.J., and Bokoch, G.M.** (1992). The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *The FASEB Journal* **6**, 2512-2513.
- 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.H., 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., and Stougaard, J.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 359-364.
- Kaplan, L., and Lynch, T.** (1999). Phaseolus (Fabaceae) in Archaeology: AMS. *Econ Bot* **53**, 261-272.
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R., and Hilson, P.** (2007). Building Blocks for Plant Gene Assembly. *Plant Physiology* **145**, 1183-1191.
- Kawasaki, M., Nakayama, K., and Wakatsuki, S.** (2005). Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 681-689.
- Ke, D., Fang, Q., Chen, C., Zhu, H., Chen, T., Chang, X., Yuan, S., Kang, H., Ma, L., Hong, Z., and Zhang, Z.** (2012). The Small GTPase ROP6 Interacts with NFR5 and Is Involved in Nodule Formation in Lotus japonicus. *Plant Physiology* **159**, 131-143.
- Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A., and Denison, R.F.** (2003). Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**, 78-81.
- Kiirika, L.M., Bergmann, H.F., Schikowsky, C., Wimmer, D., Korte, J., Schmitz, U., Niehaus, K., and Colditz, F.** (2012). Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in Medicago truncatula Stimulates Early Mycorrhizal and Oomycete Root Colonizations But Negatively Affects Rhizobial Infection. *Plant Physiology* **159**, 501-516.
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.** (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**, R36.
- Kiss, E., Oláh, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbola, A., Lózsza, 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 Physiology* **151**, 1239-1249.

- Ko, J.-H., Jeon, H.-W., Kim, W.-C., Kim, J.-Y., and Han, K.-H.** (2014). The MYB46/MYB83-mediated transcriptional regulatory programme is a gatekeeper of secondary wall biosynthesis. *Annals of Botany*, mcu126v121-mcu126.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Meth* **9**, 357-359.
- Lev, S., Halevy, D.B., Peretti, D., and Dahan, N.** (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology* **18**, 282-290.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, 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 Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R.J., Bilgin, D.D., Radwan, O., Neece, D.J., Clough, S.J., May, G.D., and Stacey, G.** (2010). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiology* **152**, 541-552.
- Ligero, F., Poveda, J.L., Gresshoff, P.M., and Caba, J.M.** (1999). Nitrate- and Inoculation-enhanced Ethylene Biosynthesis in Soybean Roots as a Possible Mediator of Nodulation Control. *Journal of Plant Physiology* **154**, 482-488.
- 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., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., and Bisseling, T.** (2009). Medicago N₂-Fixing Symbiosomes Acquire the Endocytic Identity Marker Rab7 but Delay the Acquisition of Vacuolar Identity. *The Plant Cell* **21**, 2811-2828.
- 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 Physiology* **140**, 221-234.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Lu, C., Zainal, Z., Tucker, G.A., and Lycett, G.W.** (2001). Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene. *The Plant Cell* **13**, 1819-1833.
- MacQueen, J.B.** (1967). Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability **1**, 281-297.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E.** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiology* **144**, 324-335.
- Marshall, E., Costa, L.M., and Gutierrez-Marcos, J.** (2011). Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1677-1686.
- Martínez-Romero, E.** (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* **252**, 11-23.
- 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 Journal* **14**, 23-34.
- Mattera, R., Arighi, C.N., Lodge, R., Zerial, M., and Bonifacino, J.S.** (2003). Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex.
- 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., and Mergaert, P.** (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 Biology* **15**, 808-818.
- Mbengue, M., Camut, S., de Carvalho-Niebel, F., Deslandes, L., Froidure, S., Klaus-Heisen, D., Moreau, S., Rivas, S., Timmers, T., Hervé, C., Cullimore, J., and Lefebvre, B.** (2010). The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation. *The Plant Cell* **22**, 3474-3488.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lounnon, 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 912-921.
- Meyerowitz, E.M.** (2002). Plants Compared to Animals: The Broadest Comparative Study of Development. *Science* **295**, 1482-1485.
- 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., and Oldroyd, G.E.** (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *The Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Mitra, R.M., and Long, S.R.** (2004). Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/Sinorhizobium meliloti symbiosis. *Plant Physiology* **134**, 595-604.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Long, S.R.** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of National Academy of Sciences* **101**, 4701-4705.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2006a). Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant Journal* **48**, 883-894.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2006b). Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 914-923.
- Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D.** (2010). Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component During Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1553-1562.
- Miyata, K., Kawaguchi, M., and Nakagawa, T.** (2013). Two Distinct EIN2 Genes Cooperatively Regulate Ethylene Signaling in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1469-1477.
- Mizuno, T.** (1998). His-Asp Phosphotransfer Signal Transduction. *Journal of Biochemistry* **123**, 555-563.
- 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.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Murray, J.D., Muni, R.R.D., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G., Laxmi, A., Cheng, X., Wen, J., Vaughan, D., Schultze, M., Sun, J., Charpentier, M., Oldroyd, G., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Chen, R., and Udvardi, M.K.** (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **65**, 244-252.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves

- altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of National Academy of Sciences* **106**, 18843-18848.
- Nakagawa, T., and Kawaguchi, M.** (2006). Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 176-180.
- Nie, Z., Hirsch, D.S., and Randazzo, P.A.** (2003). Arf and its many interactors. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 396-404.
- Noel, K.D., Vandenbosch, K.A., and Kulpaca, B.** (1986). Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *Journal of Bacteriology* **168**, 1392-1401.
- Noel, K.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., and Cevallos, M.A.** (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *Journal of Bacteriology* **158**, 148-155.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K.-i., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., and Kawaguchi, M.** (2005). *klavier (klv)*, A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *The Plant Journal* **44**, 505-515.
- Okazawa, K., Sato, Y., Nakagawa, T., Asada, K., Kato, I., Tomita, E., and Nishitani, K.** (1993). Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 25364-25368.
- Oldroyd, G.E., and Geurts, R.** (2001). *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before. *Trends in Plant Science* **6**, 552-554.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519-546.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A.** (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**, 119-144.
- Oldroyd, G.E.D., Engstrom, E.M., and Long, S.R.** (2001). Ethylene Inhibits the Nod Factor Signal Transduction Pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* **13**, 1835-1849.
- Papa, R., and Gepts, P.** (2003). Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor Appl Genet* **106**, 239-250.
- Peel, G.J., Pang, Y., Modolo, L.V., and Dixon, R.A.** (2009). The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *The Plant Journal* **59**, 136-149.
- Peltzer Meschini, E.P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., Beker, M.P., Kuster, H., Puhler, A., and Aguilar, O.M.** (2008). Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Molecular Plant Microbe Interaction* **21**, 459-468.
- Penmetsa, R.V., and Cook, D.R.** (1997). A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* **275**, 527-530.
- Penmetsa, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., and Cook, D.R.** (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**, 998-1008.
- Pereira-Leal, J.B., and Seabra, M.C.** (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Phillips, C.A., L. Croker, J., S., Garcia-Lepe, R., Lewis, M.J., and Hedden, P.** (1999). Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *The Plant Journal* **17**, 547-556.
- Pislariu, C.I., D. Murray, J., Wen, J., Cosson, V., Muni, R.R.D., Wang, M., A. Benedito, V., Andriankaja, A., Cheng, X., Jerez, I.T., Mondy, S., Zhang, S., Taylor, M.E., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Chen, R., and Udvardi, M.K.** (2012). A *Medicago truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Physiology* **159**, 1686-1699.

- Prayitno, J., Rolfe, B.G., and Mathesius, U.** (2006). The Ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiology* **142**, 168-180.
- Preuss, M.L., Serna, J., Falbel, T.G., Bednarek, S.Y., and Nielsen, E.** (2004a). The Arabidopsis Rab GTPase RabA4b localizes to the tips of growing root hair cells. *The Plant Cell* **16**, 1589-1603.
- Preuss, M.L., Kovar, D.R., Lee, Y.R., Staiger, C.J., Delmer, D.P., and Liu, B.** (2004b). A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiology* **136**, 3945-3955.
- Preuss, M.L., Schmitz, A.J., Thole, J.M., Bonner, H.K., Otegui, M.S., and Nielsen, E.** (2006). A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol* **172**, 991-998.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrechtsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., and Stougaard, J.** (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal* **26**, 3923-3935.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585-592.
- Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I., and Florencio, F.J.** (2004). The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology* **134**, 1718-1732.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E.** (2013). Insights into post-transcriptional regulation during legume-rhizobia symbiosis. *Plant Signal Behaviour*, 8:e23102.
- Riely, B.K., Lougnon, G., Ané, J.-M., and Cook, D.R.** (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *The Plant Journal* **49**, 208-216.
- Rípodas, C., Via, V.D., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2013). Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **68**, 81-89.
- Robinson, D.G., Scheuring, D., Naramoto, S., and Friml, J.** (2011). ARF1 Localizes to the Golgi and the Trans-Golgi Network. *The Plant Cell Online* **23**, 846-849.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., and Gamas, P.** (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* **77**, 817-837.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., and Duc, G.** (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ -ray mutagenesis. *Plant Science* **111**, 63-71.
- 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., Hayashi, M., and Kawaguchi, M.** (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* **19**, 610-624.
- Samaj, J., Muller, J., Beck, M., Bohm, N., and Menzel, D.** (2006). Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**, 594-600.
- Sambrook, J., Russel, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbour).
- Savouré, A., Magyar, M., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. *EMBO Journal* **13**, 1093-1102.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-195.

- Schauser, L., Handberg, K., Sandal, N., Stiller, J., Thykjær, T., Pajuelo, E., Nielsen, A., and Stougaard, J.** (1998). Symbiotic mutants deficient in nodule establishment identified after T-DNA transformation of *Lotus japonicus*. *Mol Gen Genet* **259**, 414-423.
- Schlaman, H.R., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R.J., and Lugtenberg, B.J.** (1991). Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Journal of Bacteriology* **173**, 4277-4287.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., and Koshiba, T.** (2000). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**, 481-488.
- Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology* **131**, 976-984.
- Simms, E.L., and Taylor, D.L.** (2002). Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 369-380.
- Singh, S., Gepts, P., and Debouck, D.** (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ Bot* **45**, 379-396.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M.** (2014). CYCLOPS, A DNA-Binding Transcriptional Activator, Orchestrates Symbiotic Root Nodule Development. *Cell Host & Microbe* **15**, 139-152.
- 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.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* **12**, 3703-3714.
- Song, S., Qi, T., Fan, M., Zhang, X., Gao, H., Huang, H., Wu, D., Guo, H., and Xie, D.** (2013). The bHLH Subgroup III d Factors Negatively Regulate Jasmonate-Mediated Plant Defense and Development. *PLoS Genet* **9**, e1003653.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M.** (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics* **9**, e1003352.
- Spaink, H.P.** (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 257-288.
- Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J., and May, G.D.** (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 110-121.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.
- Subramanian, S., Fu, Y., Sunkar, R., Barbazuk, W.B., Zhu, J.-K., and Yu, O.** (2008). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* **9**, 160.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D.M., Bright, L., Oldroyd, G., and Harris, J.M.** (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal* **46**, 961-970.
- Surpin, M., and Raikhel, N.** (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 100-109.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K.-i., Uchiumi, T., Higashi, S., Han, S.-Y., Yoshida, S., Asami, T., and Abe, M.** (2004). Control of Nodule Number by the Phytohormone Abscisic Acid in the Roots of Two Leguminous Species. *Plant and Cell Physiology* **45**, 914-922.
- 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*. *The Plant Journal* **54**, 335-347.
- 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.

- Tohme, M.J., González, D. O., Beebe, S. and Duque, M. C.** (1996). AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sc.* **36**, 1375-1384.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L.** (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotech* **28**, 511-515.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L.** (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* **7**, 562-578.
- Trieu, A., and Harrison, M.** (1996). Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *The Plant Cell* **16**, 6-11.
- van Batenburg, F.H.D., Jonker, R., and Kijne, J.W.** (1986). Rhizobium induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiologia Plantarum* **66**, 476-480.
- 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 de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K.-i., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E., and Mergaert, P.** (2010). Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Science* **327**, 1122-1126.
- Vance, C., Graham, P., and Allan, D.** (2000). Biological Nitrogen Fixation: Phosphorus - A Critical Future Need? In *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, F. Pedrosa, M. Hungria, G. Yates, and W. Newton, eds (Springer Netherlands), pp. 509-514.
- Vazquez, M., Davalos, A., de las Penas, A., Sanchez, F., and Quinto, C.** (1991). Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. *Journal Bacteriology* **173**, 1250-1258.
- Velasquez, V.L., and Gepts, P.** (1994). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* **37**, 256-263.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E.** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 1191-1208.
- Wen, B.-Q., Xing, M.-Q., Zhang, H., Dai, C., and Xue, H.-W.** (2011). Rice Homeobox Transcription Factor HOX1a Positively Regulates Gibberellin Responses by Directly Suppressing EL1F. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**, 869-878.
- Xu, J., and Scheres, B.** (2005). Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity. *The Plant Cell* **17**, 525-536.
- Yang, Z.** (2002). Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants. *The Plant Cell* **14**, S375-S388.
- Yang, Z., and Fu, Y.** (2007). ROP/RAC GTPase signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 490-494.
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M.S., Szczyglowski, K., Morieri, G., Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., Nielsen, M.W., Rusek, A.M., Sato, S., Tabata, S., James, E.K., Oyaizu, H., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2009). Rearrangement of Actin Cytoskeleton Mediates Invasion of *Lotus japonicus* Roots by *Mesorhizobium loti*. *The Plant Cell* **21**, 267-284.
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A., Mayer, K.F.X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D.R., Meyers, B.C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., Zhou, S., Mudge, J., Bharti, A.K., Murray, J.D., Naoumkina, M.A., Rosen, B., Silverstein, K.A.T., Tang, H., Rombauts, S., Zhao, P.X., Zhou, P., Barbe, V., Bardou, P., Bechner, M., Bellec, A., Berger, A., Berges, H., Bidwell, S., Bisseling, T., Choisne, N., Couloux, A., Denny, R., Deshpande, S., Dai, X., Doyle, J.J., Duzde, A.-M., Farmer, A.D., Fouteau, S., Franken, C., Gibelin, C., Gish, J., Goldstein, S., Gonzalez, A.J., Green, P.J., Hallab, A., Hartog, M., Hua, A., Humphray, S.J., Jeong, D.-H., Jing, Y., Jocker, A.,**

- Kenton, S.M., Kim, D.-J., Klee, K., Lai, H., Lang, C., Lin, S., Macmil, S.L., Magdelenat, G., Matthews, L., McCarrison, J., Monaghan, E.L., Mun, J.-H., Najjar, F.Z., Nicholson, C., Noirot, C., O'Brien, M., Paule, C.R., Poulain, J., Prion, F., Qin, B., Qu, C., Retzel, E.F., Riddle, C., Sallet, E., Samain, S., Samson, N., Sanders, I., Saurat, O., Scarpelli, C., Schiex, T., Segurens, B., Severin, A.J., Sherrier, D.J., Shi, R., Sims, S., Singer, S.R., Sinharoy, S., Sterck, L., Viollet, A., Wang, B.-B., Wang, K., Wang, M., Wang, X., Warfsmann, J., Weissenbach, J., White, D.D., White, J.D., Wiley, G.B., Wincker, P., Xing, Y., Yang, L., Yao, Z., Ying, F., Zhai, J., Zhou, L., Zuber, A., Denarie, J., Dixon, R.A., May, G.D., Schwartz, D.C., Rogers, J., Quetier, F., Town, C.D., and Roe, B.A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**, 520-524.
- 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 Physiology* **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. *The Plant Cell* **22**, 4142-4157.
- Zhang, Y., and McCormick, S. (2010). The regulation of vesicle trafficking by small GTPases and phospholipids during pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* **23**, 87-93.
- Zhu, D., Wu, Z., Cao, G., Li, J., Wei, J., Tsuge, T., Gu, H., Aoyama, T., and Qu, L.-J. (2014). TRANSLUCENT GREEN, an ERF Family Transcription Factor, Controls Water Balance in Arabidopsis by Activating the Expression of Aquaporin Genes. *Molecular Plant* **7**, 601-615.