



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Caracterización funcional de la vía del
microRNA390/TAS3 en el desarrollo de órganos laterales
en las raíces de la leguminosa Medicago truncatula***

Tesista: Lic. Karen Vanesa Hobecker

Director/a: Dra. María Eugenia Zanetti

Codirector/a: Dr. Flavio A. Blanco

Año: 2019



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**

**“Caracterización funcional de la vía del
microRNA390/TAS3 en el desarrollo de órganos
laterales en las raíces de la leguminosa
Medicago truncatula”**

Lic. Karen Vanesa Hobecker
Directora: Dra. María Eugenia Zanetti
Co-director: Dr. Flavio A. Blanco



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
Laboratorio Biología de la Raíz
UNLP-CONICET

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

Al CONICET por la beca doctoral que posibilitó la realización de la presente tesis.

Al Dr. Martín Crespi, *Institute of Plant Sciences Paris Saclay IPS2*, por su ayuda en el presente trabajo y sus aportes en mi formación.

A la Dra. Pilar Bustos por ceder vectores para el presente trabajo.

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

Al Dr. Mauricio Reynoso que me guió en mis primeros pasos en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por todos los buenos momentos compartidos: Carla, Cristina, Marcos, Joaquín, Claudio, Efren, Priscila, Virginia, Carolina R., Ana Claudia, Carolina G., Milagros, Santiago y Melisse.

A Soledad por las largas horas de discusión académica y por su paciencia.

A mis padres Graciela y Julio por su apoyo incondicional.

A mis hermanos Javier, Andrés y Germán por su apoyo, compañía y amistad.

A los CPAs del Instituto, especialmente a Claudio, Paula, Silvana, Luciana, Ulises y Juliana por sus aportes en el trabajo diario dentro del laboratorio.

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

A mis amigos de Misiones y La Plata, que son muchos para nombrar, pero su amistad y apoyo fueron fundamentales durante estos años de doctorado.

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

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

Hobecker KV, Reynoso MA, Bustos-Sanmamed P, Wen J, Mysore KS, Crespi M, Blanco FA and Zanetti ME. (2017). The MicroRNA390/TAS3 Pathway Mediates Symbiotic Nodulation and Lateral Root Growth. *Plant Physiol.* 174(4):2469-2486. doi: 10.1104/pp.17.00464.

Reynoso MA, Traubenik S, Hobecker KV, Blanco FA and Zanetti ME. Post-transcriptional reprogramming during root nodule symbiosis. En prensa.

Traubenik S, Reynoso MA, Lancia M, Hobecker KH, Rosen B, Town C, Blanco FA and Zanetti ME. Reprogramming of root cells during nitrogen-fixing symbiosis entails dynamics polysome association of coding and non-coding RNAs. En revisión.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia del estudio de las plantas leguminosas	3
2. Desarrollo de órganos post-embriónicos en las raíces de las plantas leguminosas ..	6
2.1. Desarrollo de las raíces laterales	7
2.2. Infección y desarrollo de los nódulos en las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno	9
2.3. Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por los rizobios en las raíces de las leguminosas	11
3. Regulación hormonal en el desarrollo de raíces laterales y nódulos en leguminosas	15
3.1. Percepción, señalización, síntesis y transporte de las auxinas y citoquininas	16
3.2. Las auxinas, las citoquininas y otras hormonas vegetales en el desarrollo de raíces laterales y nódulos	20
4. Regulación génica en plantas	23
4.1. Regulación post-transcripcional mediada por microRNAs.....	26
4.2. MicroRNAs asociados al desarrollo de raíces laterales y nódulos en <i>M. truncatula</i>	32
5. La vía del microRNA390/TAS3	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
1. Hipótesis y objetivo general	37
2. Objetivos específicos	37
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA VÍA MIR390/TAS3 DURANTE EL DESARROLLO DE RAÍCES LATERALES Y NÓDULOS EN LA LEGUMINOSA MODELO <i>M. TRUNCATULA</i>	
RESULTADOS	39
1. Patrón de expresión de los componentes de la vía miR390/TAS3 asociado al desarrollo de órganos laterales en raíces de <i>M. truncatula</i>	39
1.1. Niveles de acumulación de los componentes de la vía de miR390/TAS3 en raíces y nódulos	39
1.2. Análisis de la expresión espacio-temporal de los genes de la vía miR390/TAS3 en raíces de <i>M. truncatula</i>	42
1.3. Expresión espacial y temporal de los genes de la vía miR390/TAS3 durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno en raíces y nódulos de <i>M. truncatula</i>	45
2. Caracterización funcional de la vía miR390/TAS3	47
2.1. Expresión ectópica del precursor del miR390b en raíces de <i>M. truncatula</i>	47
2.2. La expresión ectópica de miR390 regula positivamente la longitud de las raíces laterales	49
2.3. La expresión ectópica del miR390 previene la formación de nódulos e hilos de infección.	50

2.4.	Inactivación de la vía miR390/TAS3	53
2.5.	Fenotipo asociado a las raíces en las plantas MIM390 y <i>ago7</i>	57
2.6.	La inactivación de la vía miR390/TAS3 produce un aumento de la formación de nódulos e hilos de infección	58
3.	Impacto de la vía miR390/TAS3 sobre la señalización molecular de la interacción simbiótica	61
3.1.	La vía miR390/TAS3 afecta la inducción de los factores de transcripción <i>NSP1</i> y <i>NSP2</i> en respuesta a <i>S. meliloti</i>	61
3.2.	La represión de miR390 en etapas tempranas de la interacción simbiótica es independiente de los NFs.....	67
	DISCUSIÓN	68
4.	Discusión Capítulo I.....	68
4.1.	El rol de la vía miR390/TAS3 sobre el desarrollo de las raíces laterales	69
4.2.	El rol de la vía miR390/TAS3 durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno ..	70
4.3.	Vinculación entre las vías de miR390/TAS3 y de nodulación.....	72
4.4.	Análisis comparativo de los fenotipos causados por la carencia de tasiARFs en diferentes especies.....	74
 CAPÍTULO II: VARIANTES ALTERNATIVAS DEL TRANSCRIPTO TAS3 Y SUS FUNCIONES DURANTE EL DESARROLLO DE RAÍCES LATERALES Y NÓDULOS EN <i>M. TRUNCATULA</i>		
	RESULTADOS	76
1.	Variantes del transcripto <i>TAS3</i> y su asociación a polirribosomas en etapas tempranas de la interacción simbiótica.....	76
2.	Las variantes del transcripto <i>TAS3</i> afectan el desarrollo de órganos laterales en las raíces de <i>M. truncatula</i>	79
2.1.	Las isoformas <i>TAS3</i> y <i>AL TAS3</i> regulan el crecimiento de las raíces en <i>M. truncatula</i> ...	79
2.2.	La isoforma <i>AL TAS3</i> promueve la formación de nódulos	81
	DISCUSIÓN	83
3.	Discusión Capítulo II.....	83
 CAPÍTULO III: CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS ASOCIADOS A LA VÍA MIR390/TAS3 EN RAÍCES DE <i>M. TRUNCATULA</i>		
	RESULTADOS	87
1.	Diseño experimental.....	87
2.	Construcción de las bibliotecas, análisis de calidad y secuenciación	88
3.	Cambios transcripcionales asociados a la sobreexpresión de miR390.....	101
4.	<i>Targets</i> putativos de la vía miR390/TAS3 en el desarrollo de raíces laterales	103
5.	<i>Targets</i> putativos de la vía miR390/TAS3 en etapas tempranas de la interacción simbiótica <i>M. truncatula-S. meliloti</i>	108
	DISCUSIÓN	115

6. Discusión Capítulo III.....	115
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	120
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material biológico	123
1.1. Material vegetal.....	123
1.2. Cepas bacterianas.....	123
2. Vectores de clonado.....	123
3. Medios de cultivo.....	124
4. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico.....	125
4.1. Amplificaciones de fragmentos de DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	125
4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	126
4.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	126
4.4. Clonados de fragmentos de PCR en el vector <i>pENTR/D-TOPO</i>	126
4.5. Recombinación sitio específica mediante el sistema <i>GATEWAY</i> (LR Clonasa).....	126
4.6. Extracción de DNA plasmídico.....	127
4.7. Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 competentes químicas.....	128
4.8. Preparación de células de <i>E. coli</i> TOP10 electro-competentes.....	128
4.9. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 competentes químicas.....	128
4.10. Transformación de células de <i>E. coli</i> TOP10 electro-competentes.....	129
4.11. Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción	129
5. Construcción de plásmidos	129
5.1. Construcción de los plásmidos para el análisis espacio temporal de los promotores de los genes de la vía del <i>miR390/TAS3</i>	129
5.2. Construcción del plásmido OX390 para la expresión ectópica del precursor del microRNA390b	130
5.3. Construcción del plásmido MIM390 para la expresión de un target mimicry de <i>miR390</i> ..	130
5.4. Construcción de los plásmidos OXTAS3 y OXALTAS3 para la expresión ectópica de <i>TAS3</i> y <i>ALT TAS3</i>	131
6. Generación de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	131
6.1. Preparación de células de <i>A. rhizogenes</i> Arqua1 electro-competentes	131
6.2. Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> Arqua1 mediante electroporación	131
6.3. Escarificación, esterilización y germinación de semillas de <i>M. truncatula</i>	132
6.4. Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i> Arqua1	132
7. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas.....	133
7.1. Crecimiento de las plantas <i>M. truncatula</i>	133
7.2. Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con <i>S. meliloti</i>	133
7.3. Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con Nod Factors (NFs)	134
7.4. Cuantificación del número de nódulos	134
7.5. Determinación del tamaño de nódulos.....	134
7.6. Determinación del peso seco de la parte aérea.....	134
7.7. Cuantificación y clasificación de los eventos de infección	135
7.8. Cuantificación de la longitud de las raíces	135

7.9. Sensibilidad de las raíces compuestas a auxinas.....	136
8. Métodos para la extracción, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos.....	136
8.1. Extracción de DNA genómico	136
8.2. Extracción de RNA total.....	137
8.3. Análisis de calidad de ácidos nucleicos	137
9. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcrito	138
9.1. Digestión de gDNA en las muestras de RNA total	138
9.2. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa	138
9.3. Ensayos de qPCR.....	138
9.4. Análisis y normalización de los datos de qPCR.....	139
10. Métodos para la cuantificación de sRNAs	139
10.1. Síntesis de cDNA mediante la técnica <i>stem-loop</i>	139
10.2. Ensayos de qPCR para sRNAs	139
10.3. Análisis y normalización de los datos de qPCR.....	140
11. Ensayo de 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	140
12. Construcción, secuenciación y análisis de las bibliotecas.....	140
12.1. Material biológico y construcción de las bibliotecas	140
12.2. Procesamiento y análisis los datos de secuenciación	141
13. Tinción histoquímica y microscopia	143
13.1. Tinción histoquímica de GUS.....	143
13.2. Microscopía óptica y electrónica	143
13.2. Microscopía confocal	144
14. Análisis bioinformáticos generales	144
14.1. Análisis general de secuencias y diseño de <i>primers</i>	144
14.2. Bases de datos de secuencias genómicas	144
14.3. Base de datos de expresión.....	145
14.4. <i>BLAST</i>	145
14.5. Alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas	145
45.6. Diagramas de <i>Venn</i>	145
14.7. Análisis de elementos regulatorios en promotores	145
ANEXO	
1. SECUENCIAS	146
2. PRIMERS	146
BIBLIOGRAFÍA	150

RESUMEN

Las plantas adaptan su arquitectura de raíz como parte de la respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, tales como disponibilidad de agua, nutrientes y estreses de tipo biótico y abiótico. En particular, las plantas leguminosas desarrollan dos tipos de órganos laterales post-embrionarios en sus raíces, las raíces laterales (RLs) y los nódulos fijadores de nitrógeno. Las RLs participan en el anclaje de la planta al suelo y en la incorporación de agua y nutrientes. Los nódulos, los cuales se desarrollan a partir de la interacción simbiótica entre las leguminosas y las bacterias del suelo conocidas como rizobios, proveen compuestos nitrogenados asimilables a la planta. Ambos órganos poseen un fuerte impacto en el crecimiento de la planta, por lo tanto la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de las RLs y los nódulos contribuiría a mejorar y aumentar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica, así como también a recuperar tierras pobres en nitrógeno y reducir el impacto negativo de los fertilizantes químicos sobre la biodiversidad.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs de 21-22 nucleótidos que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica en organismos eucariotas durante el desarrollo de nuevos órganos o en respuesta a estímulos ambientales. En los últimos años, se han descrito miRNAs cuyos niveles se acumulan diferencialmente en diferentes etapas del desarrollo de las RLs o nódulos, sin embargo sólo un número reducido de ellos han sido caracterizados en detalle y asociados con una función en la infección rizobiana y/o la organogénesis y desarrollo del nódulo. En el presente trabajo de tesis doctoral se propuso como objetivo general caracterizar la vía de miR390/TAS3 durante el desarrollo de los órganos laterales en las raíces de la leguminosa modelo *M. truncatula*. El miR390 se asocia a la proteína ARGONAUTA7 y posee como *target* al transcripto no codificante *TAS3*, a partir del cual se generan los *trans-acting interference small RNA* (tasiRNAs). Estos tasiRNAs regulan mediante un mecanismo de clivaje los niveles de los transcriptos que codifican los Factores de Transcripción Regulados por Auxinas (ARF)2, ARF3 y ARF4, por lo que han sido denominados tasiARFs. Estudios previos en nuestro laboratorio, sugirieron que la vía miR390/TAS3 estaría involucrada en la infección rizobiana y/o en la organogénesis del nódulo. Con el fin de evaluar la acumulación y la expresión espacio-temporal de los transcriptos y los pequeños RNAs que componen esta vía en diferentes estadios de desarrollo de los órganos laterales de la raíz, se llevaron a cabo reacciones de RT-qPCR y fusiones transcripcionales de los promotores a los genes reporteros *gfp* y *uidA* (también conocido como gen *gus* dado que codifica la proteína β -

glucuronidasa (GUS)). Estos resultados mostraron que la vía miR390/TAS3 se reprime en etapas tempranas de la interacción entre *M. truncatula* y *S. meliloti*, liberando la represión post-transcripcional de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. A su vez, hemos identificado y validado una nueva variante del transcripto *TAS3* que probablemente actúa como un *target mimicry* endógeno de miR390 y contribuiría a disminuir los niveles de miR390 en esta etapa. En estadios más avanzados de la interacción, la vía es re-activada quedando restringida a la zona apical del nódulo. Para indagar sobre la función de la vía se generaron raíces transgénicas que sobreexpresaban el precursor de miR390b (OX390) o un *target mimicry* de miR390 (MIM390) capaz de secuestrar al miR390 y bloquear su acción. Además de la estrategia de expresión *target mimicry*, se utilizaron líneas mutantes en el gen *AGO7*, en las cuales la vía miR390/TAS3 se encuentra inactiva. La evaluación del fenotipo asociado a la arquitectura de raíz y a la nodulación en las plantas OX390, MIM390 y *ago7* reveló que la vía miR390/TAS3 actúa como un regulador positivo sobre la elongación de las RLs, posiblemente como consecuencia del incremento de la señalización y/o respuesta a auxinas, y como un módulo represor de la infección rizobiana y el desarrollo de nódulos. A su vez, la inactivación de la vía miR390/TAS3, ya sea en las raíces MIM390 o *ago7*, resultó en el desarrollo de nódulos que presentan una distribución espacial y morfología alterada. El análisis de la acumulación de transcriptos, previamente descritos como marcadores de la nodulación, en las raíces OX390, MIM390 y *ago7* permitió establecer una correlación entre los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* y dos factores de transcripción de la familia GRAS designados *NSP (Nodulation Signaling Pathway)1* y *NSP2*, sugiriendo que ambos factores de transcripción serían los candidatos por medio de los cuales la vía de miR390/TAS3 y la vía de señalización de la nodulación se intersectan.

Con el objetivo de identificar genes cuyos niveles de acumulación se encuentran afectados directa o indirectamente por la sobreexpresión de miR390, se caracterizó el transcriptoma de las raíces OX390 en presencia y ausencia del rizobio mediante RNA-seq. El análisis *in silico* de los datos generados permitió identificar genes con expresión diferencial regulados negativamente o positivamente en respuesta a la sobreexpresión de miR390. Entre estos, se destacan genes marcadores de nodulación, factores de transcripción miembros de la familia LOB, genes involucrados en la respuesta y señalización de hormonas y genes relacionados con la traducción.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han permitido avanzar en el conocimiento sobre la regulación post-transcripcional de genes durante dos procesos de desarrollo con relevancia ecológica y agronómica. Este conocimiento podría ser aplicado en etapas futuras a la optimización de incorporación de nutrientes y nitrógeno en las plantas, contribuyendo a mejorar y aumentar el rendimiento de los cultivos de leguminosas.

INTRODUCCIÓN

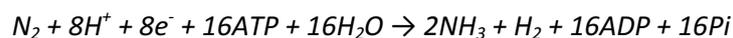
1. Importancia del estudio de las plantas leguminosas

Con alrededor de 730 géneros y más de 18.000 especies, la familia *Fabaceae*, cuyos miembros comúnmente se denominan leguminosas, constituye la tercer familia más grande del reino vegetal, en la cual se incluyen árboles, arbustos y plantas herbáceas perennes o anuales de extensa distribución mundial (Hofer and Noel Ellis, 2014). Dentro de sus representantes se destacan la soja (*Glicine max*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*), el maní (*Arachis hypogaea*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), la arveja (*Pisum sativum*) y la lenteja (*Lens culinaris*) debido a su importancia agronómica (Figura 1). Estas leguminosas de grano se caracterizan por poseer un alto contenido proteico (20-30 % p/p proteína/semilla), además de ser una fuente importante de hidratos de carbono (56-58 % p/p), grasas (1-1.6 % p/p), hierro, calcio y fósforo, por lo cual son ampliamente utilizadas para la alimentación humana y animal. La soja es actualmente la principal leguminosa de consumo mundial, mientras que el poroto constituye la fuente primaria de la dieta proteica en países como México y Brasil. La producción de garbanzo ha aumentado en los últimos 30 años, debido al aumento en el rendimiento de sus cultivos, ubicándose como la tercer leguminosa alimenticia más importante (FAO, 2016). Por otro lado, la alfalfa (*Medicago sativa*) y diferentes especies de tréboles (*Medicago hispida*, *Melilotus alba*, *Trifolium repens*, entre otras) son utilizadas como plantas forrajeras. Las leguminosas también tienen uso industrial, como productoras de gomas y tintóreas. Las gomas son exudados vegetales que resultan frente a una agresión (incisión natural o artificial) y contienen polisacáridos heterogéneos que son utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y textil. Dentro de esta categoría se destacan las leguminosas *Ceratonía siliqua* (algarrobo, goma garrofín), *Cyamopsis tetraganoloba* (goma guar) y *Astragalus gummifer* (goma de tragacanto). Entre las tintóreas, el árbol *Haematoxylon campechianum* es conocido ya que de su tallo se extrae el colorante histológico violeta denominado hematoxilina. Además algunas especies, como el Ceibo (*Erythrina crista-galli*, flor nacional de Argentina), son utilizadas como plantas ornamentales.



Figura 1. Leguminosas de interés comercial, industrial y agronómico. A. Soja (*Glycine max*). B. Poroto (*Phaseolus vulgaris*). C. Garbanzo (*Cicer arietinum*). D. Arveja (*Pisum sativum*). E. Maní (*Arachis hypogaea*). F. Alfalfa (*Medicago sativa*). G. Campeche (*Haematoxylon campechianum*). H. Ceibo (*Erythrina crista-galli*).

Una característica particular de la familia de plantas leguminosas es que establecen asociaciones simbióticas con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno, las cuales son conocidas colectivamente como rizobios. El nitrógeno es un nutriente fundamental para el desarrollo de los organismos, ya que forma parte de las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Si bien el 78 % de la atmósfera terrestre está constituida por nitrógeno gaseoso (N_2), esta molécula no puede ser asimilada directamente por la mayoría de los organismos debido a la alta energía requerida para romper el triple enlace covalente, requiriéndose otras formas químicas de N_2 , como el amonio, los nitritos y los nitratos para su asimilación. Solamente un pequeño grupo de organismos procariontes tiene la capacidad de reducir directamente el N_2 atmosférico en amonio gracias al complejo enzimático nitrogenasa, el cual cataliza la siguiente reacción:



Estos microorganismos pueden encontrarse en vida libre o asociarse a las plantas en una relación simbiótica fijadora de N_2 . Dicha simbiosis se divide en dos grupos: la simbiosis entre plantas y cianobacterias, la cual está más ampliamente distribuida, y la simbiosis llevada a cabo en los nódulos de las raíces, la cual se encuentra restringida a las familias *Fabaceae*, *Fagales*, *Cucurbitales* y *Rosales*. Las *Fagales*, *Cucurbitales* y *Rosales* (excepto *Parasponia*) se asocian con bacterias gram-positivas (del género *Frankia*), mientras que, las leguminosas (*Fabaceae*) y *Parasponia* pueden interactuar con las bacterias gram-negativas del género *Rhizobium* (Delaux et al., 2015). Como consecuencia de la asociación entre leguminosas y rizobios se desarrolla un nuevo órgano en la raíz de la planta, el nódulo, dentro del cual el rizobio reduce el N_2 atmosférico en compuestos asimilables por la planta en un proceso conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

La FBN genera un gran interés económico y agronómico ya que es económica y ecológicamente sustentable para la incorporación de compuestos nitrogenados al suelo. Uno de los factores limitantes en la producción agropecuaria es la baja disponibilidad de estos compuestos en el suelo, esenciales para el crecimiento de los cultivos. El desarrollo del proceso de Haber-Bosch llevó a la producción industrial de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados a partir del año 1.913. Sin embargo, la utilización indiscriminada de estos fertilizantes conlleva graves problemas ambientales y socio-económicos. Solamente una pequeña fracción del amonio de los fertilizantes es incorporado por las plantas, mientras que el resto es convertido en distintos compuestos nitrogenados. Una porción del nitrógeno retorna a la atmósfera en forma de óxido nitroso (N_2O), un gas de efecto invernadero. Otra parte del nitrógeno es convertido en distintos óxidos de nitrógeno que generan lluvia ácida, afectando la productividad de los suelos (Galloway et al., 2008). Los microorganismos nitrificantes convierten el amonio en nitratos (NO_3^-), los cuales lixivian hacia las napas y cursos de agua provocando su eutrofización (Gruber and Galloway, 2008). En este proceso se produce una gran proliferación de algas y plantas en la superficie del agua que disminuye la llegada de la luz solar al lecho, impidiendo que los microorganismos y las plantas lleven a cabo la fotosíntesis, y en consecuencia, oxigenen el agua. Por estos motivos se produce un gran daño ecológico debido a la pérdida de biodiversidad (Erisman et al., 2013). Además, la ingesta de agua con altos contenidos de nitratos está asociada con diversas patologías, como un aumento en el riesgo de contraer distintos tipos de cáncer y el síndrome del bebé azul, una patología que afecta la hemoglobina y en consecuencia el transporte de oxígeno en la sangre. Por otro lado, el uso indiscriminado de fertilizantes trae aparejado problemas sociales y económicos. La producción industrial de fertilizantes es un proceso costoso desde el punto de vista económico y no sustentable que consume grandes cantidades de residuos fósiles para alcanzar las altas presiones y temperaturas requeridas para la reacción de síntesis del proceso Haber-Bosch. En este contexto, la FBN surge como una alternativa a la utilización de los fertilizantes químicos. Además, la interacción entre leguminosas y rizobios se ve favorecida en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, lo que permite a las leguminosas propagarse bien en suelos pobres en nutrientes, beneficiando a la agricultura y reduciendo la contaminación y el daño ambiental causado por la fertilización (Graham and Vance, 2014).

El estudio y mejoramiento de la FBN entre leguminosas y rizobios mediante la aplicación de técnicas derivadas de la biología molecular y biotecnología moderna contribuirá a mejorar y aumentar el rendimiento de los cultivos, así como también a recuperar tierras pobres en nitrógeno y reducir el impacto negativo de los fertilizantes químicos sobre la biodiversidad. Por este motivo, la comunidad científica que estudia la biología de leguminosas

ha seleccionado a las especies *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* como sistemas modelos, basándose en diversas características. En particular, *M. truncatula* posee un ciclo de vida relativamente corto, un genoma diploide pequeño (470-550 Mbp) y es fácil de fecundar. Presenta un tamaño pequeño por lo que no se requieren grandes superficies para cultivar un alto número de plantas. A esto se le suma la disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares, como bibliotecas de secuencias expresadas (ESTs), plataformas de microarreglos de DNA y secuenciación masiva que permitieron la generación de datos de expresión para distintos órganos y estadios de desarrollo (Benedito et al., 2008; Roux et al., 2014), bancos de mutantes de TILLING (<http://revgenuk.jic.ac.uk/TILLING.htm>) y de inserciones del transposón de tabaco *Tnt1* (Pislariu et al., 2012), así como también métodos de transformación estable y transitoria (*Medicago truncatula* handbook, 2006. <https://www.noble.org/medicago-handbook/>). Por otra parte, su simbionte bacteriano (*Sinorhizobium meliloti*) ha sido estudiado ampliamente y la secuencia completa del genoma de este microorganismo se encuentra disponible públicamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1004>).

2. Desarrollo de órganos post-embrionarios en las raíces de las plantas leguminosas

Las plantas se caracterizan por retener la capacidad de generar nuevos órganos a través de su vida, lo que les confiere la plasticidad necesaria para adaptarse constantemente a las diferentes condiciones ambientales, tales como disponibilidad de agua, luz, nutrientes y estreses de tipo biótico y abiótico. Los tejidos responsables de la formación de estos nuevos tejidos y órganos, conocidos como meristemas, están compuestos por células indiferenciadas que se dividen activamente y poseen la capacidad de diferenciarse. El meristema apical aéreo (SAM, por *shoot apical meristem*) es el que da lugar a la formación de las hojas y flores en la parte aérea de las plantas, mientras que el meristema apical radicular (RAM, por *root apical meristem*) genera nuevas células para la elongación y crecimiento de la raíz. A su vez, las plantas leguminosas poseen la capacidad de desarrollar en sus raíces dos tipos de órganos laterales post-embrionarios, las raíces laterales (RLs) y los nódulos fijadores de nitrógeno, a partir de células diferenciadas. La formación de estos dos órganos requiere entonces de la diferenciación de células de diferentes tipos celulares de la raíz. Además, la organogénesis de ambos órganos precisa la coordinación de procesos de desarrollo altamente regulados, incluyendo divisiones celulares, determinación de la polaridad y comunicación celular. Estos

procesos involucran respuestas moleculares, las cuales son reguladas por las hormonas vegetales, principalmente las auxinas y citoquininas.

2.1. Desarrollo de las raíces laterales

El sistema radical de las plantas es fundamental para el desarrollo vegetal ya que permite el anclaje de las plantas al suelo, así como también la incorporación de agua y nutrientes para su crecimiento. Las raíces son altamente sensibles a las señales exógenas del ambiente, tales como el estrés biótico (patógenos, simbiontes y bacterias promotoras del crecimiento) y abiótico (disponibilidad de agua y nutrientes).

En las plantas dicotiledóneas y gimnospermas el sistema radical es pivotante, el cual consiste en una raíz principal (RP) que se origina a partir de la radícula formada en el embrión, y las RLs, que se desarrollan post-embriónariamente a partir de la RP principalmente en función de las condiciones ambientales. *Arabidopsis thaliana* ha sido adoptada como planta modelo para el estudio del desarrollo de las raíces debido a su estructura histológica radical simple y su fácil manipulación para ensayos de microscopía e histoquímica (Malamy and Benfey, 1997; Péret et al., 2009). En el eje radial de la RP se pueden distinguir varias capas tisulares. La capa más interna se denomina vasculatura y está compuesta por el floema y el xilema, tejidos encargados de la conducción de agua y nutrientes a través de la planta. Rodeando a la vasculatura se encuentra el periciclo, tejido en el cual se dan las primeras divisiones celulares para la formación de la RL. Luego, está la endodermis, la cual forma una barrera natural entre la parte más interna de la raíz y el córtex. Seguida a la endodermis se encuentra el córtex, tejido compuesto de una sola capa celular en *Arabidopsis* (Malamy and Benfey, 1997) y de varias capas en otras especies. En *M. truncatula* se distinguen hasta cinco capas de córtex (Figura 2 A; Xiao et al., 2014). El tejido más externo es la epidermis o rhizodermis, el cual se encuentra en contacto directo con el medio y sus células se pueden diferenciar en pelos radicales. A su vez, la RP se puede dividir en diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal (Figura 2 B; Ishikawa and Evans, 1995). Cerca de la punta de la raíz se encuentra el meristema apical, donde las células se encuentran en división y darán lugar a las diferentes capas celulares. En la zona de elongación las células dejan de dividirse y comienzan a elongarse. Entre estas dos zonas se encuentra el meristema basal, el cual tiene una función crítica en la especificación de células fundadoras de las RLs (De Smet, 2012). Por encima de la zona de elongación está la zona de diferenciación en la que las células se diferencian, por ejemplo para formar pelos radicales.

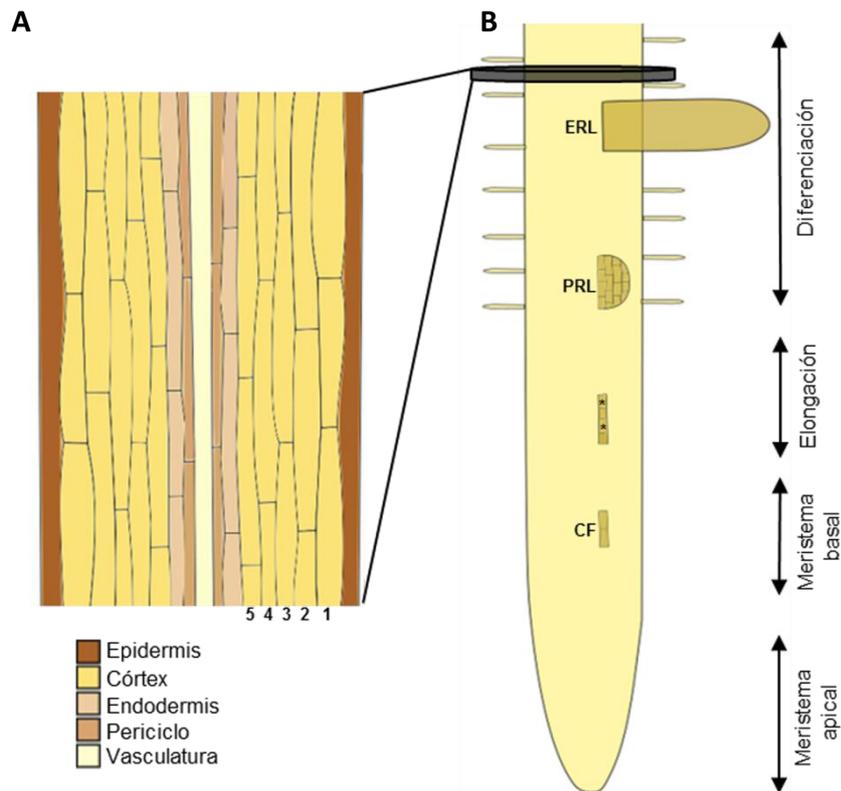


Figura 2. Esquema ilustrativo de la organización de la raíz principal y desarrollo de la raíz lateral en *M. truncatula*. A. Diferentes capas celulares de la raíz principal. Los números indican las diferentes capas del córtex. B. Organización longitudinal de la raíz principal indicando las diferentes zonas en el desarrollo de la raíz lateral. CF: células fundadoras. PRL: primordio de la raíz lateral. ERL: emergencia de la raíz lateral. Los asteriscos señalan las primeras divisiones de las CF en el periciclo.

El desarrollo de las RLs se puede dividir en diferentes etapas: iniciación, formación del primordio de la RL, organización del meristema, emergencia y elongación de la RL (Figura 2 B). La iniciación de las LR comienza en las células del periciclo en contacto con el xilema. Estas células se denominan células fundadoras (Dubrovsky et al., 2000; De Smet et al., 2006). Las células fundadoras, en respuesta a estímulos ambientales o endógenos, se de-diferencian para iniciar la formación del primordio de las RLs en localizaciones específicas (De Smet et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008; Dubrovsky et al., 2011). En *Arabidopsis*, únicamente las divisiones de las células del periciclo dan origen al primordio de la RL (Dubrovsky et al., 2006). Sin embargo, en otras especies también las divisiones celulares de la endodermis y del córtex contribuyen a la formación del primordio. En *M. truncatula* las divisiones en el periciclo, la endodermis y el córtex interno contribuyen a la organogénesis del primordio de la RL (Herrbach et al., 2014). Luego de la formación del primordio, se desarrolla el meristema y el primordio emerge a través de la epidermis. Posterior a la emergencia, el meristema controla el crecimiento de la raíz promoviendo la proliferación y elongación celular. El desarrollo de las RLs es un proceso altamente regulado por auxinas en las diferentes etapas (Lavenus et al., 2013; Bensmihen,

2015) (Detallado en sección 3, Regulación hormonal en el desarrollo de raíces laterales y nódulos en leguminosas).

2.2. Infección y desarrollo de los nódulos en las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno

La formación de un nódulo funcional depende de la activación y la coordinación de dos programas genéticos independientes en la raíz de la planta: la organogénesis del nódulo y la infección bacteriana (Oldroyd et al., 2011). En *M. truncatula* la organogénesis del nódulo comienza con la re-activación de las divisiones celulares en el periciclo, la endodermis y el córtex para dar lugar al primordio nodular (Xiao et al., 2014). Por otro lado, el proceso de infección bacteriana ocurre, en la mayoría de las leguminosas, mediante un sofisticado mecanismo intracelular que da lugar a la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección (IT, por *infection thread*) (Figura 3). El primer paso de este mecanismo consiste en la adhesión de la bacteria principalmente a los pelos radicales (Figura 3 A). En respuesta al rizobio, los pelos radicales se deforman, reorientando su crecimiento polar para formar un rulo. La bacteria queda atrapada, se divide y forma una microcolonia (Figura 3 B). Luego, se degrada la pared celular vegetal, se produce la invaginación de la membrana plasmática y comienza a formarse el IT. El rizobio se divide dentro del IT, el cual avanza a través de la epidermis hacia el córtex y se ramifica hasta llegar al primordio del nódulo. Mientras el IT avanza, las células que van a dar lugar al primordio nodular comienzan a dividirse (Figura 3 C). Una vez que el IT alcanza el primordio, las bacterias son liberadas dentro de las células del córtex (C4 y C5 en *M. truncatula*; Xiao et al., 2014) envueltas en una membrana derivada de la célula vegetal, formando estructuras denominadas simbiosomas (Figura 3 D). Dentro de los simbiosomas se produce la diferenciación de los rizobios a bacteroides, responsables de la fijación activa de N_2 .

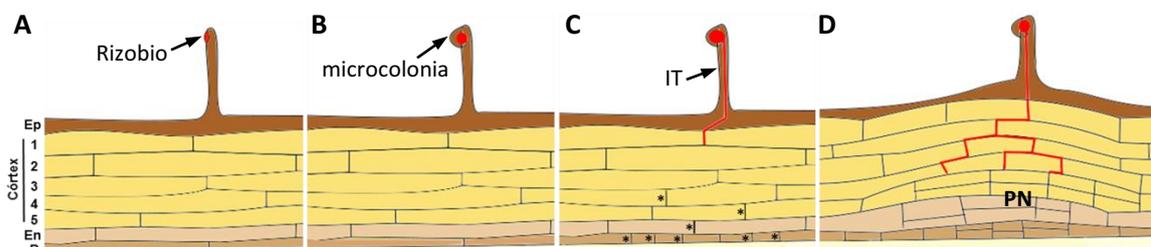


Figura 3. Esquema de la infección rizobiana mediante la formación de hilos de infección y organogénesis del nódulo en *M. truncatula*. **A.** Adhesión del rizobio al pelo radical en crecimiento. **B.** Deformación del pelo radical y multiplicación del rizobio formando una microcolonia. **C.** Formación del hilo de infección (IT) y progresión del mismo a través de la epidermis y del córtex. Al mismo tiempo, empiezan las primeras divisiones celulares del periciclo, endodermis y las capas más internas del córtex (señaladas con asteriscos) para formar el primordio nodular. **D.** Progresión y ramificación del IT hacia las células del córtex en división, en las cuales se van a liberar los rizobios para infectar el primordio del nódulo. Ep: epidermis. En: Endodermis. P: periciclo. PN: primordio del nódulo.

Dependiendo de la especie de leguminosa pueden distinguirse dos tipos de nódulos, los determinados y los indeterminados (Figura 4 A-B). Las leguminosas de climas templados, como *M. truncatula*, *M. sativa* y *P. sativum*, desarrollan nódulos de tipo indeterminado; mientras que las leguminosas de climas tropicales, como *L. japonicus*, *G. max* y *P. vulgaris*, forman nódulos determinados. Los nódulos indeterminados maduros se caracterizan por la presencia de un meristema apical persistente responsable del crecimiento del nódulo, dando lugar a un órgano de forma cilíndrica. A su vez, estos nódulos presentan zonas claramente diferenciadas (Figura 4 C): la zona I o meristemática contiene células indiferenciadas; la zona II o de infección, donde las bacterias son liberadas; la zona intermedia II-III, donde los rizobios empiezan a diferenciarse a bacteroides y la zona III o de fijación, cuyas células contienen simbiosomas maduros con bacteroides completamente diferenciados donde se produce la fijación del N_2 . Luego de varias semanas, los nódulos desarrollan una zona IV o de senescencia, en donde la fijación de N_2 cesa y las células vegetales y bacterianas degeneran. En los nódulos indeterminados el primordio nodular se desarrolla a partir de divisiones celulares del periciclo, la endodermis y del córtex interno. El meristema del nódulo maduro deriva de las células C3 del córtex, mientras que las células C4 y C5 dan lugar a las células infectadas en la base del nódulo. Las divisiones celulares del periciclo y la endodermis forman los haces vasculares y los tejidos periféricos no infectados del nódulo (Xiao et al., 2014). Por otro lado, los nódulos determinados desarrollan un meristema a partir de las células del córtex externo y su actividad meristemática desaparece tempranamente, dando lugar a nódulos esféricos, que crecen por expansión celular (Rolfe and Gressho, 1988). La zona de infección y fijación de un nódulo determinado es la región central.

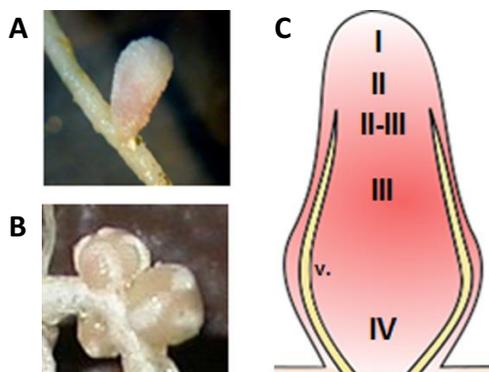


Figura 4. Diferentes tipos de nódulos desarrollados en las raíces de las plantas leguminosas. A. Fotografía de un nódulo del tipo indeterminado desarrollado en la raíz de *M. truncatula*. **B.** Fotografía de un nódulo del tipo determinado en la raíz de *L. japonicus*. **C.** Esquema ilustrativo de la morfología de un nódulo maduro indeterminado. **I:** Zona I o meristemática. **II:** Zona II o de infección. **II-III:** Zona II-III o intermedia. **III:** Zona III o de fijación de N_2 . **IV:** zona IV o de senescencia. **v.:** haces vasculares.

2.3. Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por los rizobios en las raíces de las leguminosas

La formación de un nuevo nódulo en la raíz requiere de una comunicación molecular coordinada y específica entre la leguminosa y el rizobio (Figura 5 A). Este intercambio de señales químicas se inicia en la rizósfera (parte del suelo inmediata a las raíces que se encuentra influenciada por la planta). Cuando la planta sensa la limitación de nitrógeno exuda flavonoides e isoflavonoides a través de sus raíces, los cuales son percibidos por los rizobios, resultando en la inducción de los genes bacterianos de nodulación o genes *NOD*. Los genes *NOD* codifican enzimas que forman parte de la vía de biosíntesis de moléculas de naturaleza lipochito-oligosacárida, conocidas como factores de nodulación (NFs, por *Nod Factors*). La percepción de los NFs por los receptores localizados en la membrana plasmática de las células epidérmicas vegetales es suficiente para desencadenar cambios moleculares y fisiológicos, como por ejemplo la curvatura del pelo radical y la activación transcripcional de genes específicos de nodulación, conocidos como nodulinas tempranas o ENODs (por, *Early NODulins* (Geurts et al., 2012). También otras moléculas bacterianas, como los exopolisacáridos, lipopolisacáridos y las proteínas efectoras, han sido descritas como requeridas para el establecimiento de la interacción simbiótica, aunque sus mecanismos de acción todavía no han sido esclarecidos (Clúa et al., 2018). Por otro lado, los rizobios sintetizan y secretan auxinas y citoquininas, hormonas esenciales para el inicio de la formación del nódulo y su desarrollo (Phillips and Torrey, 1970; Sturtevant and Taller, 1989; Camerini et al., 2008; Bianco and Defez, 2010). Cepas rizobianas mutantes en los genes *NOD* incapaces de sintetizar NFs, pero modificados genéticamente para sobreproducir citoquininas, son capaces de formar pseudonódulos (estructuras similares a nódulos poco desarrollados sin ocupación por rizobios), aunque las citoquininas sintetizadas por los rizobios *wild type* (WT) no son esenciales para la nodulación, aportando una mínima contribución (Cooper, 1994; Kisiala et al., 2013). Con respecto a las auxinas, cepas de rizobios que sobreproducen esta hormona regulan positivamente la nodulación y el tamaño del meristema del nódulo (Camerini et al., 2008).

En las últimas décadas, la comunidad científica ha avanzado significativamente en la comprensión de los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno (Figura 5 B). Estos avances han sido logrados principalmente mediante la identificación y caracterización genética de mutantes con pérdida o ganancia de función en las leguminosas modelos *L. japonicus* y *M. truncatula*. La percepción de los NFs involucra receptores de membrana de tipo Serina/Treonina quinasa con dominios extracelulares LysM (*lysin motif*), los cuales fueron denominados NFP (*Nod Factor Perception*) y LYK3 (*LYsM*

receptor like Kinase III) en *M. truncatula* y sus genes ortólogos NFR (*Nod Factor Receptor*)¹ y NFR5 en *L. japonicus*, respectivamente. Mutantes de pérdida de función en estos genes tienen fenotipos no nodulantes y carecen de las respuestas tempranas de la simbiosis, como la deformación de los pelos radicales y la formación de ITs (Arrighi et al., 2006; Smit et al., 2007). Los dominios extracelulares LysM son los responsables de unir oligosacáridos con residuos de N-acetil-glucosamina (Mulder et al., 2006), mientras que los dominios intracelulares de tipo quinasa son los responsables de iniciar la transducción de señal mediante la fosforilación de proteínas. Se ha evidenciado que los receptores NFR1 y NFR5 interactúan *in vivo* (Madsen et al., 2011), además el receptor NFR1 presenta actividad quinasa *in vitro*, mientras que, NFR5 posee un dominio quinasa atípico que posiblemente carezca de actividad (Arrighi et al., 2006; Klaus-Heisen et al., 2011). Recientemente se ha caracterizado un receptor del tipo LysM con actividad quinasa denominado NFRe, capaz de fosforilar a NFR5 *in vitro* (Murakami et al., 2018). NFRe es capaz de percibir NFs e inducir la señalización molecular necesaria para la interacción simbiótica en *L. japonicus*. Plantas mutantes con pérdida de función del gen *NFRe* desarrollan un menor número de nódulos sin encontrarse afectada los eventos de infección rizobiana (Murakami et al., 2018).

El reconocimiento de los NFs por los receptores NFP y LYK3, desencadena cambios periódicos en la concentración de calcio alrededor y dentro del núcleo (Ehrhardt et al., 1996; Shaw and Long, 2003), promoviendo cambios transcripcionales requeridos para la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo. Estas oscilaciones de los niveles de calcio son conocidas como *calcium spiking*. El mecanismo por el cual la señal generada en la membrana plasmática como consecuencia de la percepción del NF es traducida al retículo endoplásmico y al núcleo para generar el *calcium spiking* es aún desconocido, aunque se han identificado varios genes requeridos para que se produzca. Entre ellos se reportó un receptor de tipo quinasa con dominios LRR (*Leucine Rich Repeat*) denominado *DMI (Doesn't Make Infections)* ² en *M. truncatula* (Endre et al., 2002) o *SYMRK (SYMBiosis Receptor Kinase)* en *L. japonicus* (Stracke et al., 2002). Mutantes de *DMI2* o *SYMRK* son incapaces de nodular o formar ITs, aunque retienen algunas respuestas frente al rizobio, como la deformación de los pelos radicales. Por otro lado, la sobreexpresión del receptor *DMI2/SYMRK* resulta en la formación espontánea de nódulos, es decir, en ausencia del rizobio (Ried et al., 2014; Saha et al., 2014). El ligando extracelular de *DMI2/SYMRK* aún no ha sido identificado. Sin embargo, se ha reportado que los dos dominios MLDs (*Malectin-Like Domain*) presentes en el dominio extracelular de *DMI2* son indispensables para la acumulación del receptor *DMI2* en respuesta al rizobio y que dicha acumulación es independiente del NF (Pan et al., 2018). El dominio MLD reconoce y une polisacáridos de tipo glucano (Schallus et al., 2008), por lo cual es posible que

DMI2 reconozca una molécula bacteriana aun no identificada. El dominio quinasa intracelular de DMI2 interacciona físicamente con la proteína HMGR1 (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) (Kevei et al., 2007). Esta enzima interviene en la síntesis de mevalonato, por lo tanto se especula que este metabolito podría actuar como un segundo mensajero que transmita la percepción de los NFs hacia el núcleo. La aplicación de mevalonato es suficiente para activar el *calcium spiking* y la expresión de genes simbióticos tanto en plantas WT como en mutantes de pérdida de función de DMI2 (Venkateshwaran et al., 2015). Otros genes involucrados en el *calcium spiking* son la proteína calcio ATPasa MCA8, responsable de bombear calcio al reservorio ubicado entre la membrana interna y externa del núcleo (Capoen et al., 2011); los canales de potasio DMI1 en *M. truncatula* (Ané et al., 2004); las nucleoporinas NUP85, NUP133 y NENA (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010) y los canales activados por nucleótidos cíclicos denominados CNGC15 *a*, *b* y *c* (*Cyclic Nucleotide-Gated Channel*), responsables de la liberación de calcio hacia el nucleoplasma, los cuales se localizan en la envoltura nuclear e interaccionan con el canal de potasio DMI1 (Charpentier et al., 2016). Una vez generadas las oscilaciones de calcio, estas son decodificadas por una proteína quinasa dependiente de calcio y cadmodulina, denominada DMI3 en *M. truncatula* (Mitra et al., 2004) y CCaMK en *L. japonicus* (Lévy et al., 2004). Mutantes en el gen *DMI3* presentan oscilaciones de calcio en respuesta al NF, pero no forman ITs (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004). Por otro lado, una mutación de ganancia de función de *DMI3* provoca la formación espontánea de nódulos (Tirichine et al., 2006; Hayashi et al., 2010). La proteína DMI3 se asocia y fosforila al factor de transcripción IPD3 (*Interacting Protein of DMI3*) en *M. truncatula* (CYCLOPS en *L. japonicus*), iniciando una activación jerárquica de factores de transcripción que desencadenan los cambios transcripciones requeridos para la simbiosis (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008; Horváth et al., 2011; Ovchinnikova et al., 2011). En *L. japonicus*, cuando CYCLOPS es fosforilado, se une al promotor del factor de transcripción NIN (*Nodule inception*), induciendo su expresión. NIN es requerido tanto para la formación de ITs como para la organogénesis del nódulo (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007). Recientemente, se ha reportado que NIN suprime la expresión de los genes ENODs, como *ENOD11* en la epidermis; sin embargo, activa la transcripción del gen que codifica para el receptor de citoquinina *CRE1* (*Cytokinin receptor 1*) en el córtex de *M. truncatula* (Vernié et al., 2015). La regulación del promotor de NIN es compleja, ya que también requiere la presencia de dos factores de transcripción de la familia GRAS, designados NSP (*Nodulation signaling pathway*)1 y NSP2. A su vez, NSP1 activa la transcripción del gen que codifica el factor de transcripción ERN1 (*ERF Required for Nodulation 1*; Middleton et al., 2007; Cerri et al., 2012), el cual es requerido para la inducción de ENODs. ERN1 y ERN2, dos factores de transcripción de la

familia AP2/ERF, poseen un rol positivo en la nodulación. En *M. truncatula* la mutante de pérdida de función del gen *ERN1*, denominado *bit1-1* (*branching infection thread 1*), afecta negativamente los procesos necesarios en las etapas tempranas de la formación del nódulo, incluyendo la inducción de ENODs, la elongación de los ITs y la formación del primordio del nódulo (Middleton et al., 2007). Se ha demostrado que *ERN1*, *ERN2* y *ERN3* se unen directamente al promotor de *ENOD11*, sin embargo *ERN3* actúa como un represor de la expresión de *ENOD11* (Andriankaja et al., 2007). De manera secuencial, *NIN* induce la expresión de *NF-YA1* y *NF-YB1*, dos de las subunidades de los factores de transcripción triméricos NF-Y (*Nuclear factor Y*, Soyano et al., 2013). Los NF-Y promueven la reactivación del ciclo celular reiniciando las divisiones mitóticas de las células del córtex requeridas para la organogénesis del nódulo (Combiér et al., 2006; Zanetti et al., 2010; Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015). A su vez, en el córtex las citoquininas son percibidas principalmente por el receptor *CRE1* en *M. truncatula* (*LHK1* en *L. japonicus*). *CRE1/LHK1* interviene en la organogénesis de nódulo y en la infección rizobiana de manera antagónica. La mutación de ganancia de función *LHK1* resulta en la formación de nódulos espontáneos (Tirichine et al., 2007); sin embargo, los mutantes de pérdida de función *lhk1-1*, exhiben hiperinfección, pero no se observan divisiones en las células del córtex para dar lugar a la formación del primordio del nódulo (Murray et al., 2007). Por otro lado, en *M. truncatula*, el silenciamiento de *CRE1* no impide la formación de los ITs, pero sí bloquea su progresión y el desarrollo de nódulos (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). *CRE1* activa un grupo de proteínas en respuesta a citoquininas denominadas RR (*Response Regulators*), entre las cuales se encuentra *RR1*, cuyos niveles de expresión aumentan en nódulos (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). *RR1* regula a sus *targets* *NSP2*, *RR4* y *bHLH* (*basic Helix-loop-Helix*, Ariel et al., 2012). Otro de los efectos de la vía de señalización mediada por *CRE1* es el cambio del transporte polar de auxinas, el cual es suprimido por la infección con el rizobio y el tratamiento con NF (Plet et al., 2011). Además, *RR4* es regulado por el factor de transcripción de la familia AP2/ERF, *EFD*, el cual es requerido para la diferenciación de los bacteriodes y la organogénesis del nódulo (Vernie et al., 2008).

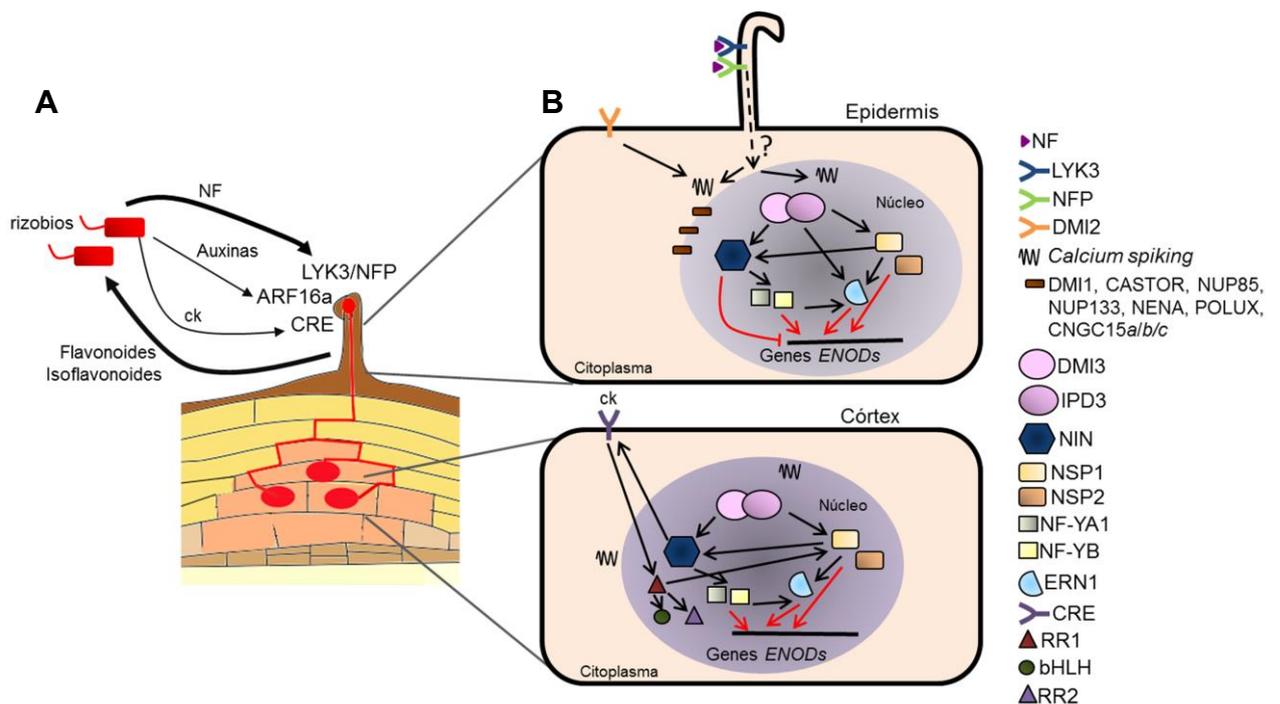


Figura 5. Respuestas moleculares desencadenadas por los rizobios en las raíces de leguminosas. **A.** En condiciones de baja concentración de nitrógeno las raíces exudan flavonoides e isoflavonoides a la rizosfera, los cuales son percibidos por los rizobios. En respuesta, los rizobios sintetizan y liberan los factores nod (NF). Las auxinas y citoquininas (ck) liberadas por los rizobios contribuirían en menor medida y podrían desencadenar respuestas moleculares en las plantas a través de CRE1 y ARF16a, respectivamente (descrito en la sección 3). **B.** El NF es percibido por los receptores NFR y LYK3 ubicados en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz. En respuesta se generan oscilaciones de calcio (*calcium spiking*) dentro y alrededor del núcleo. Para que tengan lugar las oscilaciones de calcio son requeridos DMI1, DMI2, CASTOR, POLUX, NENA, NUP85/133 y GNGC15. Las oscilaciones son decodificadas por la quinasa DMI3, la cual fosforila a IPD3, iniciando una activación jerárquica de los factores de transcripción NIN, NSP1/2, NF-Y, ERN1, que finaliza con la reprogramación celular requerida para la nodulación. En el córtex, las ck son percibidas por el receptor CRE1, el cual activa al factor RR1 que regula a RR4, NSP1 y el factor de transcripción bHLH.

3. Regulación hormonal en el desarrollo de raíces laterales y nódulos en leguminosas

Las hormonas vegetales controlan en gran medida la fisiología de la planta, como por ejemplo la floración, la formación del fruto, la germinación de las semillas, el crecimiento y la senescencia. Contrariamente a los animales, en el reino vegetal cada hormona interviene en varios procesos, y también, un mismo proceso suele estar regulado por la acción de varias hormonas. Existen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones vegetales. El desarrollo de las RLs y nódulos fijadores de nitrógeno está finamente regulado por la acción de varias hormonas, entre las que se encuentran el ácido abscísico, las giberilinas, los brasinoesteroides y las estrigolactonas (Nagata and Suzuki, 2014). Sin embargo, los principales reguladores hormonales en el

desarrollo de órganos laterales de la raíz son las auxinas y las citoquininas, las cuales poseen acciones antagónicas.

3.1. Percepción, señalización, síntesis y transporte de las auxinas y citoquininas

La percepción de las auxinas ocurre mediante una vía de señalización en el núcleo, conocida como “*repressor of a repressor*” (Figura 6 A; Pierre-Jerome et al., 2013). En condiciones de baja concentración de auxinas, la actividad de los Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs, por *Auxin Response Factors*) se encuentra reprimida mediante su interacción con las proteínas represoras Aux/IAAs (*Auxin/Indole-3-acetic acid*) y el co-represor TPL (*Topless*). Al aumentar la concentración de auxinas, las proteínas TIR1/AFBs (*Transport inhibitor response1/Auxin signaling F-box proteins*) unen auxinas formando un complejo con los co-receptores Aux/IAAs. Esta interacción promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAAs seguida de su degradación mediada por el proteosoma produciendo la liberación de los ARFs. El mecanismo de este modelo es actualmente el más estudiado, sin embargo sólo se aplica a los ARFs que actúan como activadores transcripcionales en respuesta auxinas. Existen pocas evidencias sobre los mecanismos moleculares de los ARFs represores e independientes de la regulación por auxinas. Se han propuesto varios modelos, los ARFs represores podrían interaccionar con los ARFs activadores y reprimir la transcripción de sus genes *targets* o bien competir por los sitios de unión al DNA (Figura 6 B; Vernoux et al., 2011). Alternativamente, los ARFs represores podrían homo o heterodimerizar y reclutar co-represores, como TPL (Figura 6 C; Causier et al., 2012).

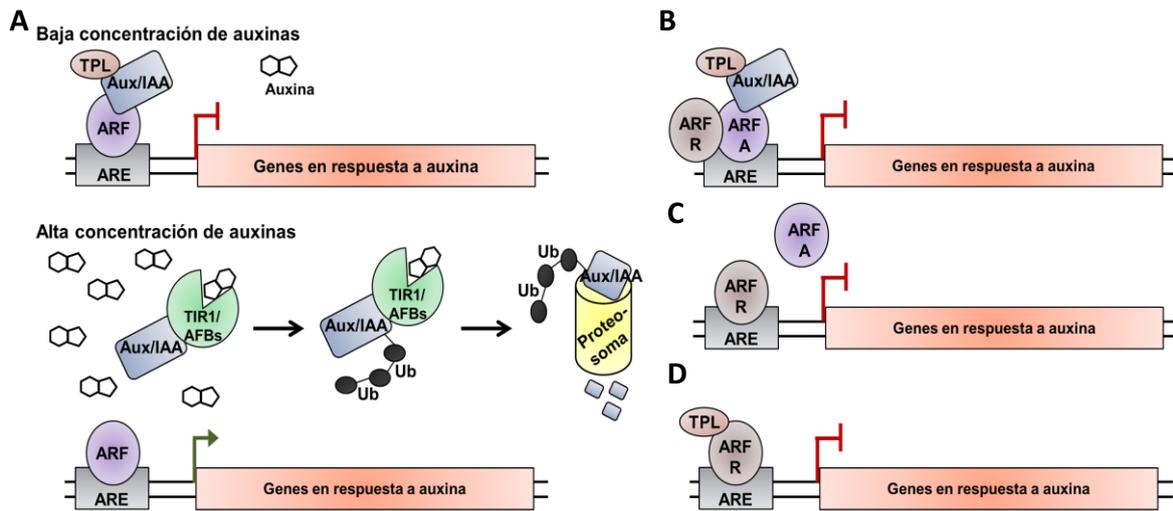


Figura 6. Modelo de la vía de señalización mediada por auxinas. A. Modelo canónico. En condiciones de baja concentración de auxinas los factores de respuesta a auxinas (ARF) interactúan con las proteínas represoras *Auxin/Indole-3-acetic acid* (Aux/IAA) e indirectamente con Toples (TLP). Esta unión inhibe la regulación de la transcripción controlada por los ARF unidas a los sitios *Auxin Response Elements* (ARE) de los genes regulados por auxinas. Cuando aumenta la concentración de auxinas, las proteínas *Transport inhibitor response1/Auxin signaling F-box proteins* (TIR1/ARFs) interactúan con las Aux/IAA provocando la liberación de los ARF y la activación de la transcripción. TIR1/ARFs promueve la ubiquitinación y degradación de Aux/IAA. **B-D. Modelos de acción de los ARFs represores.** **B.** Los ARFs represores (ARF R) podrían interactuar e inhibir la actividad de los ARFs activadores (ARF A), con o sin presencia de Aux/IAA y TLP. **C.** Los ARFs R podrían competir con los ARFs A por la unión a los sitios ARE. **D.** Los ARFs R unidos a los sitios ARE podrían interactuar con proteínas represoras, como TPL e inhibir la transcripción de sus genes *targets*.

Las proteínas ARFs, Aux/IAAs y TIR1/AFBs pertenecen a familias con múltiples genes. En *Arabidopsis* se han descrito 23 genes codificantes para los factores ARFs (Liscum and Reed, 2002), 29 genes que forman la familia de las proteínas AUX/IAAs y seis TIR1/AFBs (Abel and Theologis, 1996); mientras que en *M. truncatula* se han identificado 24 *locus* para los ARFs (Shen et al., 2015). La combinación entre estas proteínas genera diversos módulos, los cuales son requeridos para diferentes programas de desarrollo. Los ARFs pertenecen a una familia de factores de transcripción que se unen a las secuencias denominadas AREs (*Auxin response elements*) presentes en los promotores de los genes tempranos de respuesta a auxinas. En el extremo N-terminal los ARFs poseen un dominio conservado DBD (*DNA binding domain*) responsable de la unión al DNA; en la mayoría de los ARFs, el extremo C-terminal contiene un dominio de dimerización conservado CTD (*C-terminal dimerization domain*). Este dominio CTD posee dos motivos denominados III y IV, los cuales facilitan la interacción con otras ARFs y con las proteínas Aux/IAA. Entre los dominios N- y C-terminal se encuentra una región no conservada conocida como MR (*Middle region*), la cual inicialmente fue propuesta como el dominio de represión o activación de la transcripción. El análisis funcional de estos dominios en protoplastos demostró que los ARFs con MRs ricas en glutaminas funcionan como activadores transcripcionales (Tiwari et al., 2003). Por lo tanto, en base a la composición de la MR, los ARFs se han clasificado como represoras o activadoras. En *M. truncatula* cinco

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

La biosíntesis y el transporte de las auxinas también forman parte de la regulación de la respuesta y la vía de señalización de auxinas durante los procesos de desarrollo. Las plantas producen diferentes auxinas, siendo el ácido indolacético (IAA) el más abundante. La biosíntesis de auxinas se produce principalmente en la parte aérea, sin embargo una pequeña proporción también se genera en las raíces. Existen dos tipos de transportes de auxinas, uno rápido y de larga distancia, que se lleva a cabo por difusión en el floema y transporta las auxinas de la parte aérea al resto de la planta, y otro lento y de corta distancia que se da hacia dentro y fuera de la célula, que puede ser por medio de difusión, o llevado a cabo mediante la acción de transportadores de membrana. El transporte de larga distancia es importante para todos los procesos de desarrollo de la planta, mientras que el transporte de corta distancia es importante sólo para algunos de ellos, como la respuesta al gravitropismo y fototropismo, el desarrollo del tejido vascular y el desarrollo de órganos laterales en la raíz (Swarup and Péret, 2012; Sato et al., 2015). Este transporte de corta distancia es conocido como transporte polar o PAT (*Polar Auxin Transport*; Robert and Friml, 2009). El PAT involucra a las proteínas localizadas en la membrana celular AUX1 y LAX (*Auxin resistant1* y *Like auxin resistant*), las cuales se encargan del influjo de auxinas, y de las proteínas PIN (*Pin-formed*), las cuales son responsables del eflujo. Las PINs se localizan de manera polar en la membrana plasmática y esta localización de algunos PINs depende de su estado de fosforilación. Cuando las proteínas PIN están fosforiladas se dirigen a la parte apical de la célula y cuando no están fosforiladas se localizan en la parte basal (Robert and Friml, 2009; Vanneste and Friml, 2009). Se han caracterizado diferentes proteínas que participan en la localización polar de las PINs, tales como las quinasas PID y PINOID y la proteínas fosfatasa PP2A (*Protein phosphatase 2A*) (Löpfke et al., 2013). Adicionalmente, se ha reportado que las auxinas regulan de diferentes maneras a las PINs, actuando positivamente sobre su transcripción, pero también las auxinas en altas concentraciones pueden afectar de manera negativa la acumulación de algunas PINs (Vieten et al., 2005). Esta regulación a diferentes niveles sugiere una regulación fina entre las auxinas, su biosíntesis, su transporte y su señalización en los procesos de desarrollo.

Por otro lado, las citoquininas se sintetizan principalmente en la raíz, aunque una pequeña parte es sintetizada en la parte aérea (Kieber and Schaller, 2014). Las citoquininas

sintetizadas por las plantas se dividen en dos grandes grupos: aquellos derivados de adeninas con cadenas derivadas de isopreno y los derivados de adeninas con cadenas aromáticas. En *Arabidopsis* predominan las isopentil-adeninas (iP) y las *trans*-zeatinas (*t-z*), sin embargo, en otras especies como maíz y arroz es más abundante la isoforma *cis*-zeatina (*c-z*) (Sakakibara, 2006). La biosíntesis de citoquininas requiere de múltiples etapas, entre ellos la modificación de la adenina, la modificación de sus cadenas y la fusión entre moléculas. Existen diferentes vías de síntesis, aunque las principales son las vías MEP (methylerythritol phosphate) dependiente de isopentiltransferasas (IPT) y la MVA (mevalonate) independiente de IPT (Miyawaki et al., 2006). Las citoquininas sintetizadas se encuentran en su forma inactiva. Para su activación en los meristemas se requieren de las enzimas fosfo-ribohidrolasas ribosa 5'-monofosfato codificadas por los genes LOG (*Lonely guy*) (Kurakawa et al., 2007). El transporte de las citoquininas a través de la planta puede ocurrir por difusión o por la intervención de transportadores específicos. Se han identificado dos cotransportadores en *Arabidopsis*, PUP1 y PUP2 (*Purine permease cotransporter*) (Bürkle et al., 2003). A su vez, la concentración de citoquininas puede ser regulada a través de su degradación, la cual es llevada a cabo por un grupo de enzimas oxidasas denominadas CKX (*Citokinin oxidase/dehydrogenase*) (Pačes et al., 1971).

La percepción de las citoquininas involucra a los receptores ubicados en la membrana plasmática HK (*Histidine kinases*)₂, HK3, HK4 y CRE1 (*Citokinin response1*). Estos receptores dimerizan en la membrana y poseen un dominio CHASE (*Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular*), el cual une citoquininas extracelular. La unión de citoquininas provoca un cambio conformacional en los receptores activando una cascada de fosforilación. El primer paso involucra la autofosforilación de los receptores, seguido por la fosforilación de un grupo de proteínas HP (*histidine phosphotransfer proteins*). Una vez fosforiladas, las HPs se transportan al núcleo donde fosforilan a las proteínas ARR (*Response regulators*) del tipo A y B. Las ARR de tipo B fosforiladas activan la transcripción de los genes de los factores de transcripción de respuesta a citoquininas CRFs (*citokinin response factors*) y también a las ARRs del tipo A. por otro lado, las ARRs del tipo A actúan como inhibidores de la señalización de citoquininas (Kieber and Schaller, 2014).

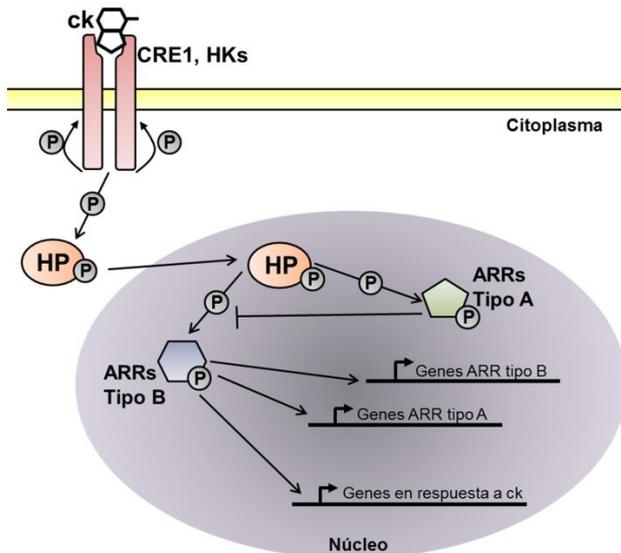


Figura 7. Vía de señalización mediada por citoquininas. Los receptores de citoquininas (ck), denominados CRE1, HK1, HK2 y HK3, dimerizan en la membrana plasmática. La unión de citoquininas a los receptores estimula el cambio conformacional de los receptores generando una cascada de fosforilación. El primer paso consiste en la autofosforilación de los receptores seguida por la fosforilación de la proteína *histidine phosphotransfer proteins* (HP). Luego, HP en el núcleo fosforila a las proteínas *Response regulators* (ARR) del tipo A y B. Las ARR del tipo B fosforiladas activan la transcripción de los genes en respuesta a citoquininas y los de las ARR del tipo A y B. Por otro lado las ARR del tipo A fosforiladas inhiben la señalización en respuesta a citoquininas.

3.2. Las auxinas, las citoquininas y otras hormonas vegetales en el desarrollo de raíces laterales y nódulos

Las auxinas son las principales reguladoras de la organogénesis y desarrollo de las RLs. La aplicación de auxinas exógenas en bajas concentraciones promueve la formación de RLs (Overvoorde et al., 2010). En *Arabidopsis* se ha vinculado la diferenciación de las células fundadoras con pulsos en la concentración de auxinas en las células del protoxilema de la zona meristemática basal de la RP, requiriéndose un máximo transitorio de auxinas para otorgar la identidad celular a las células fundadoras (De Smet et al., 2007). Estos cambios requieren de las proteínas transportadoras de auxinas AUX1 y PIN1/7. Por otra parte, mutaciones en el gen GNOM, el cual regula la localización de las proteínas PIN, provoca la pérdida de los pulsos de auxinas y disminuye la formación de RLs (Okumura et al., 2013). Plantas mutantes con pérdida de función del gen *PIN3* tienen un menor número de primordios de RLs, pero un mayor número de células fundadoras, por lo que se propone que *PIN3* es indispensable para la iniciación de la formación del primordio de la RL. Cada etapa de desarrollo de las RLs requiere de uno o más módulos de auxinas (combinaciones entre diversas ARFs y Aux/IAA), aunque la forma en que estos módulos moleculares interactúan y están regulados no ha sido todavía dilucidado (Lavenus et al., 2013). Por otro lado, se requieren altas concentraciones de auxinas y de la expresión del gen de respuesta a auxinas *PLT* (*Plethora*) en la punta de la raíz para el correcto mantenimiento del meristema (Mähönen et al., 2014). La pérdida de actividad de *PLT* afecta el meristema, promoviendo la diferenciación celular (Galinha et al., 2007).

El estudio del rol de las auxinas y citoquininas en la nodulación ha aportado evidencias que sugieren que las citoquininas actuarían como reguladores positivos al inicio de la formación del nódulo, mientras que las auxinas inhibirían la iniciación del nódulo en leguminosas que forman nódulos de tipo indeterminado. La aplicación exógena de citoquininas en raíces de diferentes leguminosas produce efectos parecidos a la aplicación del NF, incluyendo la activación de algunos marcadores tempranos de la nodulación como ENOD40, y en algunos casos provoca la formación de pseudonódulos (Cooper, 1994; Frugier et al., 2008; Heckmann et al., 2011). Por otro lado, el efecto del tratamiento de las raíces con auxinas exógenas depende de su concentración: a bajas concentraciones ($<10^{-7}$ M de IAA) el número de nódulos en *M. truncatula* aumenta, sin embargo, a concentraciones altas la formación de nódulos se inhibe. La inhibición del PAT mediante el tratamiento con NPA (Ácido N-1-naftilftalámico) y TIBA (ácido 2,3,5-triyodobenzoico) resulta en la formación de pseudonódulos en las raíces (Bensmihen, 2015). Las bases moleculares de cómo se vinculan la regulación por auxinas y citoquininas durante el desarrollo del nódulo aún no están del todo elucidadas, aunque hay evidencia de que las citoquininas inhibirían el transporte polar de auxinas en las primeras etapas de la interacción simbiótica (Bensmihen, 2015).

La caracterización de mutantes de pérdida de función de genes que componen la vía de señalización de auxinas y citoquininas ha llevado a la identificación de proteínas esenciales para la regulación de la infección bacteriana y la organogénesis del nódulo. El silenciamiento de las proteínas de flujo de auxinas PIN1 y PIN2, mediante RNA de interferencia, resulta en una reducción en el número de nódulos formados en *M. truncatula* (Huo et al., 2006). Por otro lado, el silenciamiento del receptor CRE1 genera insensibilidad de las raíces a las citoquininas, resultando en la reducción de la formación de nódulos en *M. truncatula* (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Mediante el desarrollo de los sensores sintéticos de dos componentes en respuesta a citoquininas (TCS, Müller and Sheen, 2008 y TCSn Zurcher et al., 2013) se ha determinado que, en *L. japonicus*, la señalización mediada por citoquininas se da primero en las células del córtex y luego se extiende hacia las células de la epidermis. En ambos tipos celulares la percepción de la hormona involucra al receptor LHK1 (Held et al., 2014; Reid et al., 2017). En *M. truncatula* los resultados son contradictorios. Por un lado, mediante el uso del sensor TCS se determinó un aumento de la concentración de citoquininas en células del periciclo y del córtex luego de la aplicación de NF (Van Zeijl et al., 2015). Sin embargo, utilizando el sensor TCSn, se ha encontrado actividad en las células epidérmicas en respuesta a NF (Jardinaud et al., 2016). Además, en los últimos años se han identificado factores de transcripción activados por citoquininas involucrados en la nodulación, entre ellos RR1, el cual regula la transcripción del gen *NSP2* (Ariel et al., 2012).

Recientemente, la caracterización de los cambios en la expresión génica en respuesta al rizobio en pelos radicales llevó a identificar genes de la señalización de citoquininas que se inducen frente al rizobio, entre ellos el receptor ya caracterizado CRE1, los receptores en respuesta a citoquininas de tipo A, RR2/3/4/8/10 y miembros de la familia LONELY GUY, LOG1/2. Además, se identificó a un factor de transcripción en respuesta a auxinas ARF16, el cual se induce significativamente en los pelos radicales luego de la inoculación con rizobios. Plantas mutantes en este gen, *arf16*, poseen un número reducido de eventos de infección (Breakspear et al., 2014).

Una vez que las raíces empiezan a desarrollar nódulos se activa un mecanismo de supresión de la nodulación, denominado autorregulación de la nodulación (AON, por Autoregulation Of Nodulation). Se estima que el costo energético para el establecimiento de los nódulos, la fijación y transporte de nitrógeno ronda entre 12-17 gr de carbono cedido por la planta por cada gramo de nitrógeno aportado por la bacteria (Crawford et al., 2000), lo cual sugiere que la formación y el mantenimiento del entorno del nódulo es energéticamente costoso para la planta. La AON involucra una señalización de larga distancia, desde la raíz a la parte aérea de la planta y, en respuesta, de la parte aérea a la raíz. Inicialmente la AON fue demostrada en *L. japonicus* mediante el sistema de raíces divididas (*split-root*) donde se agregan rizobios a diferentes tiempos, lo que resulta en la supresión de la formación de nódulos en la última raíz inoculada (Kosslak and Bohlool, 1984). Las bases moleculares de la AON fueron inicialmente identificadas mediante experimentos de injertos en las mutantes supernodulantes denominadas *sun* (*super numeric nodules*) en *M. truncatula*, *har1* (*hyper nodulation and aberrant root 1*) en *L. japonicus* y *nark* (*nodule autoregulation receptor kinase*) en *G. max* (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002; Searle et al., 2003; Oka-Kira et al., 2005; Ferguson et al., 2010; Kawaguchi and Minamisawa, 2010). Los experimentos de injertos determinaron que el fenotipo supernodulante es causado por la parte aérea de la planta y es mediado por el receptor tipo quinasa LRR CLV1 (CLAVATA1), el cual se expresa en el floema de la parte aérea y en los nódulos (Nontachaiyapoom et al., 2007). En *L. japonicus*, los péptidos CLE-RS1 (CLE-root signal 1) y CLE-RS2, están propuestos como las moléculas móviles que llevarían la señal de la raíz a la parte aérea. Estos péptidos se sintetizan en la raíz en presencia del rizobio, se transportan por el xilema y se ha demostrado que se unen al receptor CLV1 (Okamoto et al., 2009; Okamoto et al., 2013). Luego de que la señal sea censada por CLV1 en la parte aérea, se genera una segunda señal hacia la raíz, sin embargo aún no se ha determinado la naturaleza de las moléculas que median esta señal. Recientemente se han propuesto a las citoquininas como estas posibles moléculas mensajeras (Sasaki et al., 2014).

En adición a la AON existen otros mecanismos inhibitorios locales de la nodulación mediados por otras hormonas, tales como el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico (Oldroyd et al., 2001; Penmetza et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Sun et al., 2006; Ding et al., 2008; Biswas et al., 2009). En *M. truncatula* la mutante del gen *sickle* (*skl*) desarrolla un fenotipo supernodulante. *Sk1* posee una mutación de pérdida de función en el gen ortólogo *EIN2* (*Ethylene insensitive 2*) de *Arabidopsis*, el cual constituye un componente de la vía de traducción de señal del etileno (Penmetza et al., 2003). Como consecuencia de la mutación, las raíces *sk1* son defectivas en la respuesta a etileno y en presencia de rizobio desarrollan numerosos ITs, los pelos radicales presentan hipersensibilidad a los NFs y el número de nódulos se encuentra incrementado (Penmetza et al., 2003; Varma Penmetza et al., 2008).

4. Regulación génica en plantas

La reprogramación génica de una planta frente a un estímulo, endógeno o exógeno, es regulada a diferentes niveles incluyendo el transcripcional, el post-transcripcional, el traduccional y la modificación post-traduccional de las proteínas (Figura 8). El primer nivel de regulación está dado por el grado de empaquetamiento del DNA en la cromatina, lo que determina la posible transcripción de los genes a través de su accesibilidad a factores que actúan en *trans*. Se distinguen dos niveles de compactación de la cromatina durante la interfase celular, la eucromatina, donde la conformación del DNA es más laxa y frecuentemente está asociada a la expresión génica activa, y la heterocromatina, donde la cromatina se encuentra más empaquetada y está asociada principalmente a secuencias repetitivas, centrómeros, telómeros y genes reprimidos en diferentes grados. Los mecanismos regulatorios de la estructura de la cromatina incluyen la metilación de citosinas, factores que afectan la posición y composición del nucleosoma y las modificaciones post-traduccionales de las histonas. La mayoría de estos mecanismos se encuentran interconectados a través de la acción de pequeños RNAs (sRNAs) que regulan el estado de compactación de la cromatina. La transcripción de ciertas regiones del genoma requiere de la apertura de la cromatina que permita el acceso a la maquinaria transcripcional a la región del DNA que va a ser transcripta. Adicionalmente, la transcripción se ve regulada a nivel de la presencia de secuencias que actúan en *cis*, de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa II DNA dependiente (RNA Pol II) que sintetiza los transcriptos primarios (pre-mRNAs, Figura 8 A). Luego de la síntesis de los primeros 10-20 (nucleótidos) nts, el pre-mRNA sufre modificaciones que incluyen la adición de 7-metilguanosa al extremo 5' (*cap* 5' m7GpppN), estructura que estabiliza el mRNA y posee una función importante durante la traducción (Bailey-Serres et al., 2009). Posteriormente

ocurre el clivaje 3' del transcripto y la adición de una secuencia poli-A a partir del extremo libre. Esta modificación protege al transcripto de la degradación y facilita su traducción. En forma cotranscripcional, los intrones son reconocidos y removidos por un complejo denominado *spliceosoma* (Figura 8 B). La remoción de intrones (*splicing*), así como también la adición de la secuencia de poli-A son procesos altamente regulados por medio de proteínas de unión al RNA específicas de cada tipo celular, de forma tal que se producen distintas formas de transcriptos. Estos procesos, conocidos como *splicing* alternativo y poliadenilación alternativa (APA), permiten que se produzca más de una proteína o transcripto con funciones regulatorias diferentes a partir de un mismo gen y se ha reportado que es determinante de las diferentes proteínas que se producirán en cada tejido y en respuesta a estímulos ambientales (Xing and Li, 2011; Eckardt, 2013).

En cada etapa de procesamiento el transcripto se asocia con proteínas de unión al RNA (RBP, RNA Binding Protein) incluyendo la proteína de unión al cap 5' (CBP) y al poli-A (PABPs), así como otras RBPs dependiendo de la secuencia del transcripto (Lorković, 2009). Estos complejos ribonucleoproteicos son transportados al citoplasma a través del poro nuclear, donde pasan por una primera ronda de traducción. Los mRNA que presentan un codón de terminación prematuro son degradados a través del mecanismo de control *non sense mediated decay*. Aquellos mRNAs que pasan el control de calidad pueden ser mantenidos en complejos traduccionalmente inactivos o bien pueden ser traducidos a proteínas. Los transcriptos se asocian a complejos ribonucleoproteicos denominados polisomas, que se forman por la asociación secuencial de los ribosomas al mRNA. Sin embargo, en algunas ocasiones algunos transcriptos antes de ser traducidos son transportados a sitios celulares específicos, como por ejemplo los mRNA secretados que son transportados al retículo endoplasmático. Por otra parte, los transcriptos pueden ser secuestrados por otros complejos (Bailey-Serres et al., 2009). Los cuerpos de procesamiento (*P-bodies*) están definidos por la presencia de proteínas involucradas en el *decapping*, deadenilación y degradación de los mRNAs. En estos sitios se ha reportado que se degradan los transcriptos y se han asociado con el clivaje dirigido por los complejos RISC-microRNAs. Los gránulos de estrés son complejos traduccionalmente inactivos que se acumulan de manera microscópicamente visible en respuesta al estrés celular (Buchan and Parker, 2009). Por otro lado, múltiples RNAs pequeños (sRNAs) regulan el silenciamiento transcripcional y post-transcripcional de los genes. Los sRNAs ejercen su acción a través de la metilación de citosinas, la degradación de mRNAs y/o la represión traduccional (Voinnet, 2009; Law and Jacobsen, 2011; Chen, 2013).

En el proceso de traducción de un mRNA se pueden distinguir tres etapas; iniciación, elongación y terminación. En organismos eucariotas, la iniciación de la traducción consiste en

la unión de la subunidad menor de ribosoma, varios factores de iniciación de la traducción y el tRNA iniciador en el extremo 5' del mRNA, formando el complejo de pre-iniciación. Este complejo escanea el 5'UTR del mRNA hasta encontrar el codón de inicio en el mRNA, donde se une la subunidad mayor del ribosoma. En la etapa de elongación, los ribosomas se desplazan por el mRNA en sentido 5' a 3', llevando a cabo la síntesis de la cadena polipeptídica. La terminación ocurre cuando el ribosoma encuentra un codón de terminación, los cuales no son reconocidos por los tRNA pero si por los denominados factores de liberación. Estos factores provocan la liberación del ribosoma de la proteína recién sintetizada. Si bien existen algunos ejemplos de regulación en los pasos de elongación y terminación en plantas (Onouchi et al., 2008), en la mayoría de los casos la regulación traduccional ocurre en la etapa de iniciación (Figura 8 C; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002; Bailey-Serres et al., 2009). Estudios previos han demostrado que la exposición de las plantas a ciertas condiciones ambientales, como deshidratación e hipoxia, causan una inhibición global en la iniciación de la traducción (Kawaguchi et al., 2004; Branco-Price et al., 2005). También existen ejemplos de regulación a nivel de mRNA individuales durante distintos estadios de desarrollo de las plantas o en respuesta a estímulos ambientales, como las transiciones luz-oscuridad, deshidratación, estrés salino y por temperatura y en raíces de leguminosas en respuesta al rizobio (Bailey-Serres, 1999; Manjunath et al., 1999; Kawaguchi et al., 2004; Branco-Price et al., 2005; Reynoso et al., 2013). Una vez sintetizada la proteína, generalmente esta sufre modificaciones requeridas para llevar a cabo su función (Figura 8 D). Las modificaciones post-traduccionales incluyen la fosforilación, metilación, acetilación, ubiquitinación, hidroxilación, glicosilación, glicación, sulfonación, prenilación, nitrosilación, nitración, SUMOilación y lipidación (Friso and van Wijk, 2015). Además la regulación post-traducciona se da a nivel de direccionamiento de las proteínas a diferentes compartimientos celulares, el plegamiento de las proteínas y su degradación.

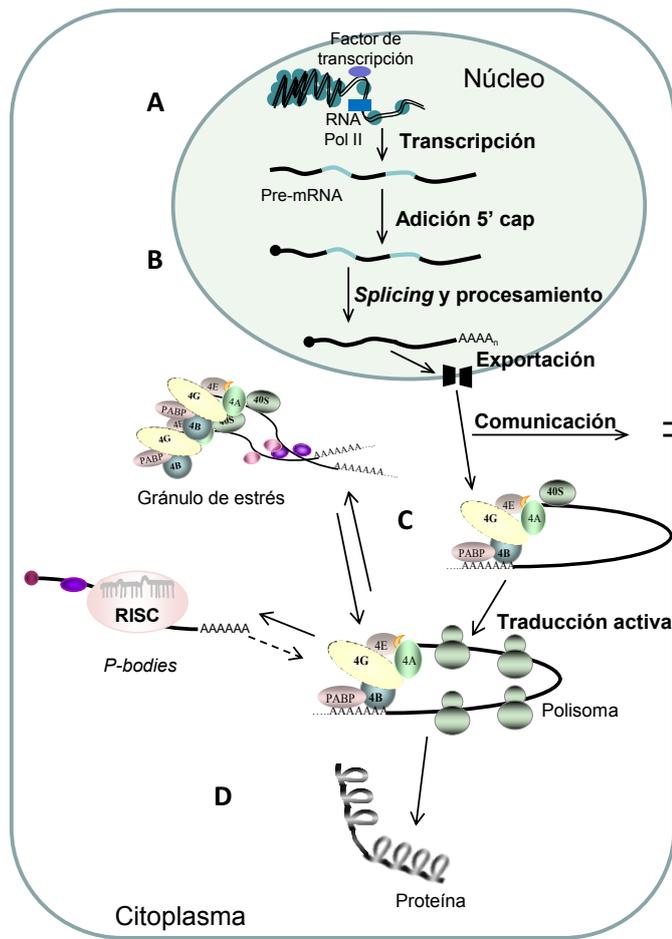


Figura 8. Regulación génica en plantas. A. La regulación transcripcional esta mediada por el grado de empaquetamiento del DNA, factores de transcripción y la RNA Pol II. B. Regulación post-transcripcional. A medida que se sintetiza el pre-RNA empiezan las modificaciones del transcrito, como ser la adición del 5 cap y de la secuencia poli-A, el *splicing* y la poliadenilación alternativa. En el citoplasma la abundancia del transcrito puede ser regulada por los miRNAs, *decapping*, o deadenilación en los *P-bodies*. A su vez, los transcritos se pueden almacenar en los gránulos de estrés. C. La regulación de la traducción ocurre en la mayoría de los casos en la iniciación de la traducción. D. Una vez sintetizada la proteína sufre diferentes modificaciones post-traduccionales, transporte a diferentes compartimentos celulares, plegamiento o puede degradarse.

4.1. Regulación post-transcripcional mediada por microRNAs

Los *sRNAs* son RNAs no codificantes de 20 a 24 nucleótidos que participan en la regulación del desarrollo, la diferenciación celular, la adaptación a cambios en las condiciones ambientales y en la respuesta de defensa en plantas. Estos *sRNAs* regulan negativamente la expresión génica mediante diferentes mecanismos: degradando RNAs mensajeros específicos (*targets*), reprimiendo su traducción o modificando el grado de compactación de la cromatina del *loci target*. Clásicamente, los *sRNAs* se clasificaron en dos grandes grupos, los pequeños RNAs de interferencia (*siRNAs*, *short-interfering RNAs*) y los microRNAs (miRNAs). Los *sRNAs* son generados a partir de precursores de RNAs de doble hebra (*dsRNA*, *double stranded RNA*) que son clivados por proteínas RNasas de tipo III, denominadas DICER-like (DCLs). La diferencia entre *siRNAs* y miRNAs reside en el origen de los *dsRNAs* precursores. Los *dsRNAs* precursores de *siRNA* se generan mediante la acción de las proteínas RDR6 (*RNA-dependent RNA polymerase 6*) y SGS3 (*Suppressor of gene silencing 3*) sobre moléculas de RNAs simple hebra provenientes de RNAs exógenos (patógenos), de transcritos codificantes o no codificantes que previamente fueron clivados por miRNAs o de regiones heterocromáticas de DNA,

transposones o regiones cercanas a centrómeros y secuencias repetitivas. Por otro lado, los miRNAs son transcritos endógenos, cuyos genes (genes *MIR*) pueden ser intergénicos o intragénicos. Los *MIR* intergénicos se transcriben como unidades transcripcionales independientes, poseen su propio promotor, exones e intrones y se transcriben por la acción de la polimerasa RNA Pol II. Por su parte, los genes *MIR* intragénicos son co-transcritos junto con otros genes de la planta, en su mayoría codificantes. Se han descritos *MIRs* exónicos e intrónicos (Dhir and Proudfoot, 2013). La transcripción de los genes *MIR* genera un transcrito primario, denominado pri-miRNA, que está sujeto a *splicing*, *splicing* alternativo y a la estabilización mediante la adición del *cap* en el 5' y la poliadenilación en el 3'. Los pri-miRNAs poseen estructuras imperfectas variadas que se caracterizan por contener uno o varios *stem-loops* y su tamaño varía entre 50 a 500 nts. Los pri-miRNAs son procesados en los complejos *dicing bodies* formados por las proteínas DCL, HYL1 (*Hyponastic leaves 1*) y SE (*serrate*) como componentes principales. DCL1 es la principal enzima procesadora de pri-miRNAs, sin embargo algunos miRNAs evolutivamente jóvenes, como miR822 y miR839, son generados mediante DCL4 (Rajagopalan et al., 2006). El procesamiento del pri-miRNA por DCL1 ocurre en dos pasos sucesivos, generando un intermediario conocido como pre-miRNA y finalmente el dúplex miRNA y su complementario, conocido como miRNA estrella (miRNA*, Figura 9). Otras proteínas han sido reportadas como promotoras del procesamiento del pri-miRNA debido a que mutaciones de pérdidas de función en sus correspondientes genes resultan en una reducción de los niveles de miRNAs maduros y altos niveles de pri-miRNAs (Yu et al., 2017). Entre estas proteínas se encuentran CBP80 (*Cap-binding protein 80*), CBP20, STA1 (*Stabilized1*), THO1/HPR1/EMU, THO2, SICKLE, TOUGH, PINP1 (*psr1-interacting protein1*) y MOS2. Por otro lado, GRP7 reprime la biogénesis de los miRNAs y las proteínas CDC5, NOT2, Elongator, PRL1 y DDL tendrían una función en la transcripción de los *MIRs* o en la estabilización del pri-miRNAs, ya que mutaciones de pérdida de función en sus genes generan niveles reducidos de pri-miRNAs y miRNAs. Una vez generado, el dúplex miRNA-miRNA* es estabilizado mediante la adición de grupos metilos en el 2' OH de los extremos 3' por la metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina HEN1 (*Hua Enhancer 1*) (Yu et al., 2005).

El mecanismo de exportación del miRNA desde el núcleo hacia el citoplasma en plantas aún no está claro. En animales actúa Exportina 5, una proteína *RanGTP-dependent dsRNA-binding protein* que media el transporte de los pre-miRNAs hacia el citoplasma. En células vegetales DCL1 se localiza en el núcleo, por lo que se especula que es el dúplex miRNA-miRNA* el que se exporta. Se ha propuesto a HASTY (Papp et al., 2003), proteína homóloga a Exportin 5, como la proteína exportadora en plantas, aunque en la mutante *hasty* la partición núcleo-citoplasma de los miRNAs no se encuentra alterada (Park et al., 2005). El complejo THO/TREX,

requerido en la biogénesis de miRNAs, media el acoplamiento transcripción-exportación de los mRNA a través de interacciones con el complejo del poro nuclear, por lo cual podría tener un rol en el transporte de los miRNAs (Köhler and Hurt, 2007). Una vez en el citoplasma, una de las hebras del dúplex miRNA-miRNA* se ensambla con la proteína ARGONAUTA (AGO) para formar un complejo ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA Induced silencing complex*). El modelo del ensamblado de RISC en *Arabidopsis* consiste en la formación de un complejo de AGO1 con el dímero HSP90 (*heat shock protein 90*), seguido por un cambio conformacional de HSP90 provocado por la unión de adenosina trifosfato (ATP). Este cambio permite la incorporación del dúplex miRNA-miRNA* seguido por la hidrólisis de ATP y la disociación de HSP90 resultando en la formación del complejo funcional RISC (Figura 9; Iki et al., 2010).

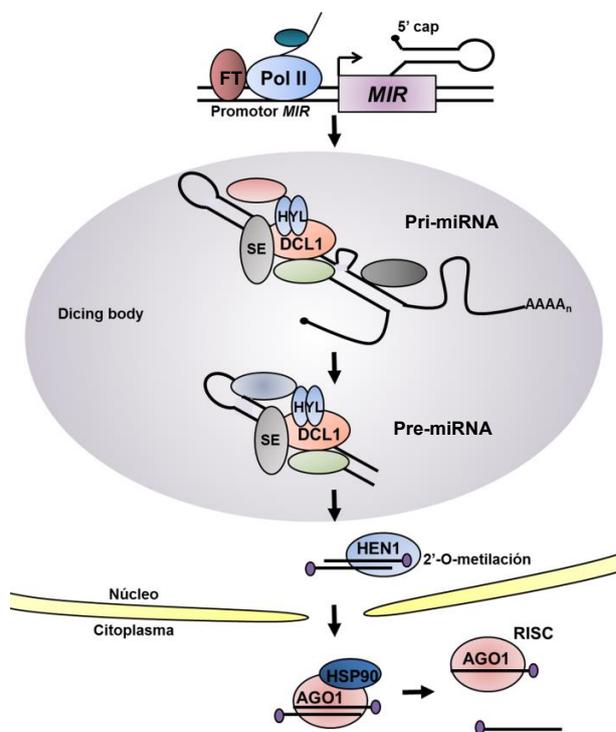


Figura 9. Biogénesis de los microRNAs. Los genes de los microRNAs intergénicos (*MIR*) son transcritos por la RNA Polimerasa DNA dependiente II (Pol II). La transcripción, al igual que en otros genes, está regulada por factores de transcripción (FT) y por la RNA Pol II. El transcrito primario (pri-miRNA) forma una estructura imperfecta de *stem-loop*, el cual es procesado en los complejos *dicing bodies* mediante las proteínas Dicer-like 1 (DCL1), Hyponastic leaves 1 (HYL1), Serrate (SE) y otras proteínas requeridas para el *splicing* en un intermediario denominado pre-miRNA. El pre-miRNA es procesado nuevamente dando lugar al dúplex miRNA-miRNA*. Este dúplex es estabilizado mediante la adición de grupos metilos en el 2'OH de los extremos 3' por una metiltransferasa dependiente de S adenosilmetionina Hua Enhancer 1 (HEN1) y exportado, por un mecanismo aún desconocido, hacia el citoplasma. En el citoplasma el dúplex miRNA-miRNA* se asocia con la proteína ARGONAUTA1 (AGO1) unida a heat shock protein 90 (HSP90). HSP90 provoca la liberación de una de las hebras de miRNA-miRNA* y finalmente el miRNA asociado a AGO1, formando el complejo *RNA Induced silencing complex* (RISC), puede actuar sobre sus transcritos *targets*.

Los miRNAs regulan post-transcripcionalmente los niveles de sus transcritos *targets* mediante dos mecanismos: el clivaje endonucleolítico y la represión traduccional, siendo el primer mecanismo el predominante en plantas (Figura 10). En el mecanismo de clivaje, el miRNA une el complejo RISC al *target* mediante complementariedad de bases y produce un corte endonucleolítico por acción de AGO1, que posee un dominio PIWI con actividad endonucleasa del tipo RNasa H. Luego, los productos 3' y 5' del *target* son degradados por exonucleasas (Figura 10 A).

Inicialmente, la identificación general de los miRNAs y del estudio de su modo de acción llevó a proponer que el grado de complementariedad entre el miRNA y su *target*

influenciaba en el modo de acción, requiriéndose un alto grado de complementariedad para el clivaje y uno menor para la inhibición traduccional (Hutvagner and Zamore, 2002). En plantas, el grado de complementariedad miRNA-*target* es muy alto, por lo cual se proponía que los miRNAs de plantas actuaban mediante clivaje. Sin embargo, se han identificado miRNAs que median la regulación traduccional (Figura 10 B) con alto grado de complementariedad miRNA-*target*, como por ejemplo miR156, miR171, miR172 y miR398, cuyos *targets* son SPL3 (*Squamosa Promoter binding protein-Like3*), SCL4 (*SCarecrow-Like protein4*), AP2 (*Apetala2*) y CSD2 (*Copper/zinc Superoxide Dismutase2*), respectivamente (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004; Gandikota et al., 2007; Brodersen et al., 2008). A su vez, se ha descrito que estos miRNAs también actúan mediante clivaje (Li et al., 2013; Hou et al., 2016; Yu et al., 2016). Por lo tanto, el grado de complementariedad de miRNAs-*targets* en plantas no sería el factor determinante del modo de acción. El mecanismo por el cual los miRNAs de plantas inhiben la traducción aún no está esclarecido. Estudios *in vitro* indican que los miRNAs pueden inhibir la traducción en la etapa de iniciación y de elongación (Iwakawa and Tomari, 2013). El estudio de mutantes ha contribuido a identificar los factores necesarios para la inhibición de la traducción mediada por miRNAs, entre los que se encuentran la proteína KTN1 (*Katanin 1*), VCS (*Varicose*) (Brodersen et al., 2008), SUO (Yang et al., 2012) y la proteína de membrana del retículo endoplasmático AMP1 (*Altered Meristem Program 1*; Li et al., 2013).

Además del clivaje y la represión de la traducción, algunos miRNAs desencadenan la producción de phasiRNAs (*phased secondary siRNAs*) a partir de sus transcriptos *targets*. Luego del clivaje del transcripto mediado por AGO1, el fragmento 3' o 5' es estabilizado por SGS3, el cual se asocia a RISC por medio del reconocimiento de características específicas del dúplex miRNA-*target* protegiendo al fragmento de la degradación (Yoshikawa et al., 2005; Yoshikawa et al., 2013). Mediante el reclutamiento y la acción de RDR6 se sintetiza la segunda hebra del fragmento generando un dsRNA. Luego, el dsRNA es clivado en fase cada 21 nts por DCL4, dando lugar a los phasiRNAs. Estos siRNAs son reclutados por proteínas AGO y forman el complejo RISC para regular negativamente los niveles de transcriptos *targets* mediante clivaje en *trans*, a través de la metilación en *cis* del DNA o volver a generar sRNA, conocidos como *siRNAs secundarios*. En *Arabidopsis*, cuatro transcriptos no codificantes de la familia *TAS* (*trans acting RNA*), *TAS1*, *TAS2*, *TAS3* y *TAS4*, generan phasiRNAs conocidos como tasiRNAs (*trans acting small interference RNA*), debido a que actúan en *trans* (Allen et al., 2005). Existen dos tipos de mecanismos en la producción de tasiRNAs basados en el número de sitios de unión de miRNA que poseen los *targets*. El mecanismo predominante es el denominado *one-hit model*, en el cual el transcripto *target* posee un solo sitio de unión y clivaje de miRNA. Este es el mecanismo que actúa sobre miR173/*TAS1*, miR173/*TAS2* y miR828-*TAS4* (Figura 10 C). Por otro

lado, el mecanismo *two-hit model* requiere dos sitios de unión del miRNA al *target* (Figura 10 D; Axtell et al., 2006). Este modelo es característico de miR390/*TAS3*, donde miR390 se une en dos sitios al transcripto *TAS3*, pero solo se produce el clivaje en el sitio más próximo al extremo 3'. El sitio de unión 5' posee un *mismatch* en el sitio de clivaje del miR390, impidiendo la acción endonucleolítica. Se ha demostrado que el sitio 5' no clivable es indispensable para la producción de tasiRNAs, ya que la sustitución del sitio 5' de unión al miR390 en *TAS3* por otros sitios de unión a miRNAs bloquea la generación de tasiRNAs (Montgomery et al., 2008). Otra característica particular del mecanismo *two-hit model* es que recluta a una proteína AGO alternativa, AGO7, la cual hasta el presente sólo se conoce que actúe en el procesamiento de *TAS3*.

La producción de phasiRNAs también se genera a partir de transcritos codificantes para proteínas, como por ejemplo los receptores *NBS-LRR* (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*), los cuales son clivados por miR1507/2109/2118 en *M. truncatula* (Cakir et al., 2016) y los transcritos *PPR* (*Pentatricopeptide Repeat*), clivados por miR7122 en Solanaceas (Xia et al., 2013).

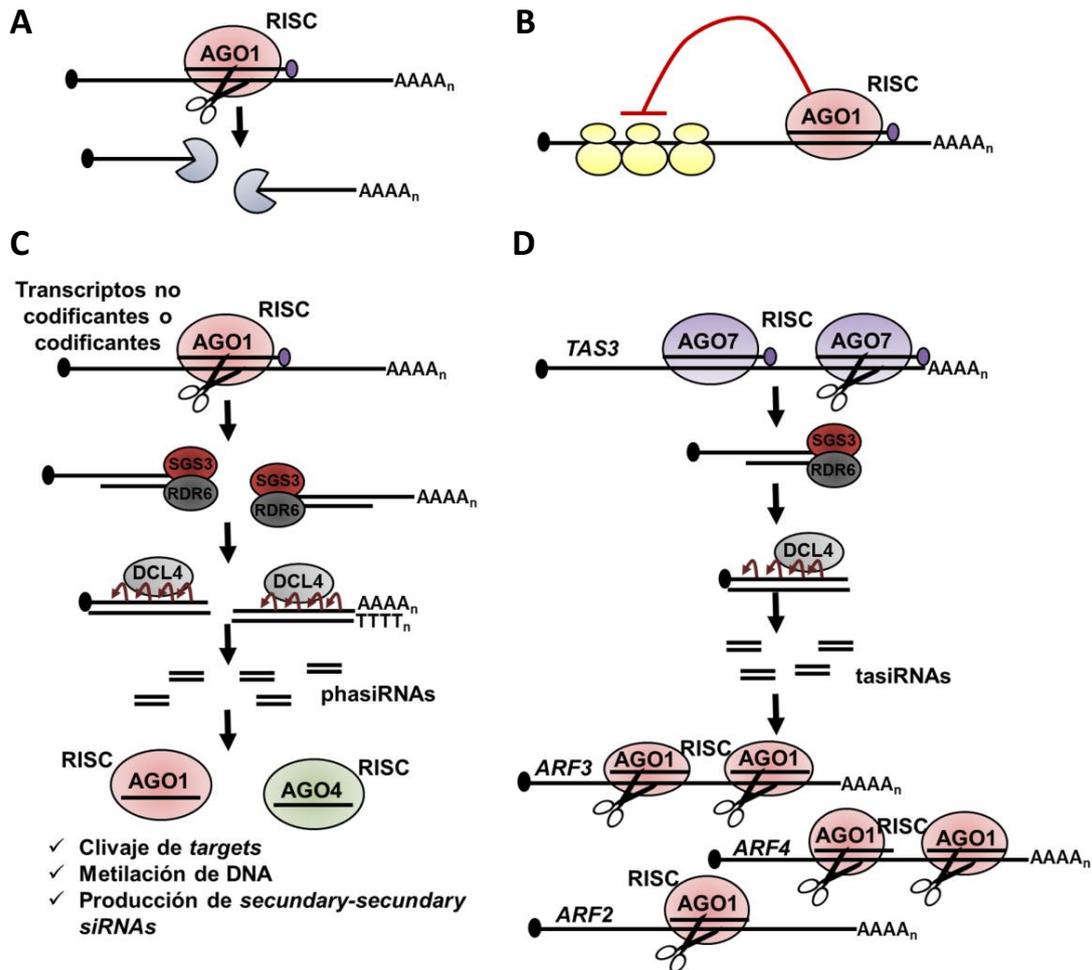


Figura 10. Modo de acción de los microRNAs. **A. Clivaje del transcripto *target*.** El miRNA asociado a ARGONAUTA 1 (AGO1) en el complejo *Induced silencing complex* (RISC) se une por complementariedad de bases al *target*. AGO1, mediante la actividad RNasa H del dominio PIWI, cliva al transcripto. Luego, los productos del clivaje son degradados por exonucleasas. **B. Inhibición de la traducción.** **C-D. Producción de phasiRNAs.** **C. *One hit model*.** El miRNA asociado al complejo RISC se une en un solo sitio al transcripto *target* y se produce el clivaje por acción de AGO1. Los productos 3' y 5' del clivaje son reclutados por RDR6 y SGS3. RDR6 sintetiza la hebra complementaria del RNA, la cual es clivada por DCL4 en fase de 21 nts. Los phasiRNAs se asocian a AGO1 o AGO4 y pueden actuar de diferentes maneras. **D. *Two hit model*.** El miR390, asociado a AGO7 en el complejo RISC, se une en dos sitios al transcripto *TAS3*, produciendo un corte sólo en el sitio más cercano al 3'. El producto 5' del clivaje es reclutado por RDR6 y SGS3 y se sintetiza la segunda hebra de RNA, la cual luego va a ser clivada por DCL4 en fase de 21 nts. Los tasiRNAs se asocian a AGO1 y actúan, mediante clivaje, sobre sus *targets* *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*.

Estudios recientes sugieren que el sitio de acción de los miRNAs y producción de los phasiRNAs estaría asociado a la membrana del retículo endoplasmático y a los polisomas. Mediante análisis de microscopía de fluorescencia se detectó a AGO1 en el citoplasma, principalmente alrededor de la membrana nuclear, pero excluida del núcleo (Derrien et al., 2012). Esta acumulación de AGO1 colocaliza con marcadores del retículo endoplasmático (Li et al., 2013). Por otro lado, se detectó la asociación de miRNAs y AGO1 a polisomas a través de un análisis de fraccionamiento subcelular (Li et al., 2016). Además, el estudio a escala global de los productos de degradación de RNAs sugieren que los *targets* de miRNAs son clivados

cuando se encuentran asociados a polisomas, incluyendo a los transcriptos no codificantes *TAS* (Hou et al., 2016; Yu et al., 2016).

4.2. MicroRNAs asociados al desarrollo de raíces laterales y nódulos en *M. truncatula*

Los primeros miRNAs fueron identificados hace aproximadamente 25 años en el nemátodo *C. elegans*. Posteriormente, estos *sRNAs* también se encontraron en plantas y animales (Bartel, 2004). En los últimos años, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva de *sRNAs* (*sRNAs*-seq), se han descrito miRNAs cuyos niveles se acumulan diferencialmente en diferentes etapas del desarrollo del nódulo; sin embargo, muy pocos han sido estudiados y asociados con una función en la infección rizobiana y/o la organogénesis y desarrollo del nódulo. Entre ellos se encuentran miR160, miR164, miR166, miR169 y miR171h, los cuales poseen como *targets* a transcriptos que codifican reguladores clave del desarrollo de nódulos y/o RLs (los factores de transcripción *ARF10/16/17*, *NAC1*, *CNA1/2/ATHB8*, *NF-YA1* y *NSP2*, respectivamente) (Combier et al., 2006; Boualem et al., 2008; Lelandais-Brière et al., 2009; D'haeseleer et al., 2011; Bustos-Sanmamed et al., 2013; Hofferek et al., 2014).

El primer miRNA caracterizado en la regulación del desarrollo de nódulos fue el miR169 (Combier et al., 2006). Este miRNA regula al factor de transcripción *Nuclear Factor YA1* (*NF-YA1*), un componente del complejo heterotrimérico NF-Y requerido para la diferenciación de las células corticales y para el mantenimiento del meristema del nódulo en *M. truncatula* (Combier et al., 2006; Zanetti et al., 2010; Soyano et al., 2013; Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015). Los niveles de expresión de *NF-YA1* aumentan significativamente en etapas tempranas de la interacción simbiótica. La sobreexpresión de miR169 en las raíces de *M. truncatula* retrasa la nodulación y altera la morfología de los nódulos, un fenotipo similar al observado por represión de la expresión de *NF-YA1* mediado por un RNA de interferencia. MiR169 se expresa en la zona de infección, mientras que *NF-YA1* se acumula en la zona meristemática del nódulo (Combier et al., 2006). Esto sugiere que miR169 contribuye a la regulación espacial de *NF-YA1* durante la diferenciación del nódulo y actúa como un regulador del desarrollo nodular, posiblemente controlando las funciones del meristema.

Otro miRNA involucrado en la regulación de la nodulación es el miR164. Este miRNA controla la estabilidad del regulador transcripcional *NAC1*, el cual pertenece a la superfamilia de factores de transcripción específicos de plantas *NAC* (cuyo nombre deriva de *NAM*, *No Apical Meristem*, *ATAF*, *Arabidopsis Transcription Activation Factor* y *CUC*, *Cup-shaped cotyledon*) y ha sido asociado con la formación de RLs en *Arabidopsis* (Olsen et al., 2005).

Análisis de expresión mediante hibridación *in situ* revelaron que miR164 y *NAC1* se expresan en la zona apical del nódulo maduro, aunque también se detectó expresión de miR164 en la zona de fijación de nitrógeno. La sobreexpresión de miR164 produce una disminución en el número de nódulos, sin embargo los nódulos desarrollados presentaron la morfología y el color rosado característicos de los nódulos indeterminados (D'haeseleer et al., 2011). Si bien se ha verificado que *NAC1* es *target* de miR164, no se detectó fenotipo al sobreexpresar, silenciar o mutar al gen *NAC1*. En *A. thaliana* se han identificado y validado seis factores de transcripción *NAC targets* de miR164 (Laufs, et al., 2004; Mallory et al., 2004). En *M. truncatula*, la predicción de posibles *targets* de miR164 basados en análisis bioinformáticos reveló cinco *targets* putativos, cuatro genes no caracterizados y un gen referido como *NAC2*. Por lo tanto, miR164 regula negativamente la formación de nódulos posiblemente a través de la regulación de los niveles de otros *targets* (D'haeseleer et al., 2011).

El miR166 ha sido asociado en la regulación del desarrollo de RLs y nódulos en *M. truncatula* (Boualem et al., 2008). Este miRNA posee como *targets* a los factores de regulación *CNA (Corona)1*, *CNA2* y *ATHB8 (HomeBox gene8)* pertenecientes a la familia de factores de transcripción denominada *class-III homeodomain-leucine zipper* (HD-ZIP III) (Boualem et al., 2008). La sobreexpresión de miR166 disminuye el número de nódulos y RLs. Además, los haces vasculares se encuentran alterados, con un incremento significativo en el número de xilemas. Estas evidencias sugieren que miR166 controla negativamente el desarrollo de los órganos laterales en las raíces de *M. truncatula*.

Un miembro de la familia de miR171, miR171h, ha sido identificado mediante el análisis del degradoma de *M. truncatula* como regulador del FT *NSP2* (Devers et al., 2011), un factor de transcripción del tipo GRAS esencial para la interacción simbiótica. El patrón de expresión espacio-temporal de miR171h y *NSP2* está estrechamente vinculado con el estado nutricional de la planta (Hofferek et al., 2014). La sobreexpresión de miR171h reduce significativamente el número de nódulos en las raíces de *M. truncatula*, un fenotipo reminiscente al observado en la línea mutante *nsp2-2* (Oldroyd and Long, 2003).

Por último, el miR160 es un miRNA conservado que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en el desarrollo de raíces en *Arabidopsis* y *M. truncatula*, así como también en la organogénesis de nódulos en las leguminosas modelos *L. japonicus* y *M. truncatula*. Este miRNA regula post-transcripcionalmente a los factores de transcripción en respuesta a auxinas *ARF10/16/17* (Wang et al., 2005). En *A. thaliana* se ha demostrado que miR160 actúa como un modulador positivo de la formación de RLs y también se lo ha relacionado al desarrollo de la cofia de la raíz y al gravitropismo (Wang et al., 2005). En *M. truncatula* se reportó que miR160 participa del desarrollo de la cofia de la raíz, pero no se observaron diferencias en la formación

de RLs. A su vez, en esta leguminosa, miR160 aumenta sus niveles en respuesta a la inoculación con el rizobio (Bustos-Sanmamed et al., 2013). Dos variantes de miR160 actúan en diferentes zonas del nódulo en desarrollo: miR160c se expresa en todas las zonas del nódulo joven en desarrollo, mientras que en el nódulo maduro su expresión se restringe a la base del nódulo y a los tejidos vasculares. Contrariamente, miR160d se expresa en la zona periférica y apical de los nódulos jóvenes y maduros. La sobreexpresión de miR160 reduce el número de nódulos por raíz en *M. truncatula* (Bustos-Sanmamed et al., 2013). En los nódulos determinados de *G. max* miR160 también actúa como un modulador negativo en la organogénesis del nódulo, sin embargo media la maduración de los nódulos a través del control del equilibrio entre auxinas y citoquininas (Turner et al., 2013b; Nizampatnam et al., 2015).

5. La vía del microRNA390/TAS3

El gen MIR390, el gen no codificante *TAS3* y los genes codificantes *ARFs* se encuentran presentes en los genomas de las plantas no-vasculares conocidas como *liverworts*, pertenecientes al grupo de las briofitas y las plantas vasculares (Finet et al., 2013; Krasnikova et al., 2013), lo cual refleja la conservación evolutiva de la vía de miR390/TAS3. Sin embargo, existen diferencias a nivel de secuencia nucleotídica y del procesamiento de *TAS3* entre las plantas no-vasculares y vasculares (Allen et al., 2005; Axtell et al., 2007).

MiR390 es uno de los miRNAs más antiguos y conservados que se ha identificado dentro del reino vegetal. A diferencia de otros miRNAs, tanto la secuencia del miR390 maduro como la secuencia del miR390* se encuentran extremadamente conservadas entre las plantas terrestres (Xia et al., 2017). Otras características de miR390 se encuentran conservadas, como la adenina inicial en la secuencia madura y el *mismatch* en la posición 11 del dúplex miR390/miR390*, las cuales están propuestas como necesarias para la correcta asociación con la proteína AGO7 (Endo et al., 2013; Xia et al., 2017).

El *locus* de *TAS3* es el componente de la vía que presenta más diferencias evolutivas. Hasta el presente, se han identificado dos genes *TAS3* denominados *TAS3-long* (*TAS3L*) y *TAS3-short* (*TAS3S*). *TAS3L* posee los dos sitios de unión a miR390, el 5' no clivable y el 3' clivable, y se procesa para generar dos tasiRNAs estables en fase (Allen et al., 2005; Axtell et al., 2006); mientras que en el transcripto *TAS3S* ambos sitios de unión de miR390 son clivables y conlleva a la producción de un único tasiRNA estable (Xia et al., 2012; Xia et al., 2015). *TAS3* presenta marcadas diferencias entre las plantas briófitas y las plantas vasculares. En las briófitas, *TAS3* se procesa para producir tasiRNAs que no sólo regulan post-transcripcionalmente a los

factores de transcripción de la familia ARF, sino que también regulan los niveles de los transcritos AP2 (Axtell et al., 2007). Además, los sitios *target* de los tasiARFs presentes en los ARFs difieren a nivel de secuencia entre las briófitas y las plantas vasculares (Allen et al., 2005; Axtell et al., 2006). Ambos transcritos *TAS3S* y *TAS3L* se encuentran presentes en los genomas de las plantas angiospermas. Particularmente, en *M. truncatula* se han identificado dos *loci* para *TAS3S* y uno para *TAS3L* (Xia et al., 2017).

La vía de miR390/*TAS3* regula diferentes procesos de desarrollo, como ser la polaridad de órganos, el desarrollo de las flores y el crecimiento de las RLs, a través de la represión post-transcripcional de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. La función de la vía en la regulación del desarrollo de la parte aérea difiere entre distintas especies. En *Arabidopsis* la mutante en el gen de *AGO7* incrementa la longitud de las hojas y regula negativamente la morfología curva del margen de las hojas (Hunter et al., 2003; Fahlgren et al., 2006). A su vez, la transición de la fase juvenil a adulta se encuentra regulada mediante la acción negativa de los tasiRNAs sobre el transcrito *ARF3*. La expresión del transcrito *ARF3* o de una versión de *ARF3* con los sitios de unión de tasiARFs mutados en la mutante nula de *RDR6* resulta en la aceleración de la transición de la fase juvenil-adulta, provoca defectos morfológicos y en la polaridad de las hojas y flores (Fahlgren et al., 2006). La mutación de los genes *WIRY*, implicados en la biogénesis de los tasiARFs, afecta el desarrollo de las hojas en plantas de tomate (*S. lycopersicum*), produciendo defectos en la expansión de la lámina foliar y la pérdida de regulación de los transcritos *ARF3* y/o *ARF4* (Yifhar et al., 2012). En monocotiledóneas, se han observado defectos de desarrollo más extremos. Por ejemplo, el bloqueo de la producción de tasiARFs en arroz (*O. sativa*) conduce a la eliminación completa o la formación anormal del SAM (Liu et al., 2007; Nagasaki et al., 2007); mientras que en maíz (*Z. mays*), la planta mutante en el gen *SGS3* desarrolla hojas radialmente simétricas, con pérdida parcial o total de la identidad celular adaxial (Juarez et al., 2004; Nogueira et al., 2007). En la leguminosa *L. japonicus*, las mutantes de los genes *REL1* y *REL3*, ortólogos de *SGS3* y *AGO7* en *Arabidopsis*, respectivamente, producen una reducción del número de folíolos y su alteración en la polaridad abaxila-adaxial (Yan et al., 2010). En *M. truncatula*, la pérdida de función del gen *AGO7/LOBEDLEAFLET1* afecta el desarrollo del margen de las hojas y la separación de los órganos aéreos laterales, sugiriendo que la vía miR390/*TAS3* actúa como un represor de los transcritos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* durante la formación de órganos o tejidos (Zhou et al., 2013).

Por otro lado, estudios sobre la función de la vía de miR390/*TAS3* en raíces sugieren que la vía actuaría como un regulador positivo sobre la longitud de las RLs. En *A. thaliana* la sobreexpresión del transcrito no codificante *TAS3* resulta en RLs de mayor longitud, sin embargo, el crecimiento de las RPs y la densidad de RLs no se encuentran afectadas.

Consistentemente, la mutación en el gen *MIR390a*, la cual disminuye los niveles de miR390 maduro y tasiARFs, provoca la reducción de la longitud de las RLs (Marin et al., 2010). A su vez, la sobreexpresión de miR390 en álamo (*Populus spp.*) resulta en RLs de mayor longitud (He et al., 2018).

Recientemente se ha demostrado que la vía miR390/*TAS3* está implicada en la interacción entre *Arabidopsis* y el nematodo parasito *root-knot*. Mediante el uso de sensores de tasiARFs y líneas mutantes del transcripto *ARF3* resistentes a tasiARFs se ha revelado que la vía es necesaria para la formación de las agallas inducidas por el parasito en las raíces (Cabrera et al., 2016). Además, la vía miR390/*TAS3* ha sido asociada a la interacción simbiótica entre *L. japonicus* y *Mesorhizobium loti*. Se ha reportado que los niveles de miR390 se encuentran enriquecidos en nódulos maduros con respecto a las raíces (De Luis et al., 2012) y que las mutantes *rel3/ago7* de *L. japonicus* desarrollan un menor número de nódulos y los eventos de infección se encuentran reducidos (Li et al., 2014).

En nuestro laboratorio, el Dr. Reynoso llevó adelante un análisis de la asociación selectiva de mRNA y sRNAs a los polisomas en raíces de *M. truncatula* a las 48 horas post-inoculación (hpi) con *S. meliloti*. Este análisis reveló que miR390 y los tasiARFs disminuyen significativamente su abundancia en respuesta al rizobio. Sin embargo, mientras que los tasiARFs disminuyen, miR390 aumenta su asociación a los polisomas en la respuesta temprana de la simbiosis (Reynoso et al., 2013; Mauricio Reynoso, Tesis Doctoral, 2013. UNLP). Consistentemente, los niveles de expresión de los transcriptos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, los cuales han sido validados experimentalmente como *targets* de los tasiARFs en *M. truncatula* (Jagadeeswaran et al., 2009; Zhou et al., 2013), presentan un aumento significativo en respuesta a la inoculación con rizobio. No obstante, la función de la vía de miR390/*TAS3* en el desarrollo de los órganos post-embriónicos laterales de leguminosas que forman nódulos del tipo indeterminado no ha sido caracterizada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis y objetivo general

Uno de los objetivos principales de la biotecnología vegetal moderna es optimizar la producción de los cultivos de importancia agronómica de manera sustentable, sin impactar negativamente en el medio ambiente. Como se ha mencionado anteriormente, la FBN, que surge de la interacción entre las plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium*, es una alternativa ecológica y económica para la incorporación de compuestos nitrogenados al suelo. El nitrógeno es un nutriente fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas e impacta directamente en el contenido proteico de las semillas. A su vez, las plantas poseen la capacidad de adaptar su sistema radical a las condiciones del medio ambiente, con el fin de optimizar la incorporación de agua y nutrientes, o frente al estrés biótico. Por lo tanto, el estudio y la manipulación biotecnológica de la arquitectura del sistema radical plantean potenciales aplicaciones en el campo de la agricultura, por ejemplo sobre la mejora de la capacidad de incorporar agua y nutrientes en suelos deficientes. Por otra parte, el esclarecimiento de las bases moleculares de la interacción entre leguminosas y rizobios permitiría a la comunidad científica desarrollar plantas en donde la FBN se encuentre favorecida, aumentando la incorporación de nitrógeno.

En los últimos años, el estudio de las bases moleculares del desarrollo de las raíces y nódulos en las plantas leguminosas modelo ha permitido identificar diversos miRNAs que actúan como reguladores en la expresión génica durante la formación de estos órganos laterales. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que el miR390 posee una expresión diferencial durante etapas tempranas de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno (Reynoso et al., 2013). Se ha propuesto que el programa de desarrollo de los nódulos deriva del programa molecular de las RLs (Desbrosses and Stougaard, 2011) y en base a que la vía de miR390/TAS3 regula la formación de RLs en *A. thaliana* (Marin et al., 2010) y a que se la ha asociado en la formación de nódulos del tipo determinado (Li et al., 2014), el objetivo general de este trabajo de investigación es estudiar la vía de miR390/TAS3 durante el desarrollo de los órganos laterales de las raíces de *M. truncatula* y dilucidar los *targets* putativos de la vía.

2. Objetivos específicos

Para poner a prueba la hipótesis general planteada se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterizar funcionalmente la vía de miR390/TAS3 mediante:
 - a. el análisis del patrón espacio-temporal de expresión de los genes que componen la vía miR390/TAS3 en raíces y nódulos de *M. truncatula*, y a diferentes tiempos luego de la inoculación con *S. meliloti*;
 - b. el análisis del fenotipo asociado al sistema radical y a la nodulación de *M. truncatula* cuando la vía miR390/TAS3 se encuentra activada, mediante la sobreexpresión del pre-miR390b (OX390), o cuando la vía miR390/TAS3 se encuentra inactiva, mediante la expresión de un *target mimicry* de miR390 (MIM390) o la mutación de pérdida de función del gen *AGO7*;
 - c. el análisis del posible efecto de la activación (OX390) e inhibición (MIM390, *ago7*) de la vía miR390/TAS3 sobre la acumulación de los transcritos involucrados en la señalización molecular de la nodulación en las raíces de *M. truncatula*.
- 2- Caracterizar funcionalmente las variantes del transcripto no codificante *TAS3* durante el desarrollo de raíces laterales y nódulos mediante el análisis del fenotipo asociado a la arquitectura de raíz y nodulación cuando se sobreexpresan independientemente las variantes *TAS3* y *AL TAS3* en las raíces de *M. truncatula*.
- 3- Caracterizar los cambios transcriptómicos causados por la sobreexpresión del pre-miR390b en etapas tempranas de la asociación simbiótica.

CAPÍTULO I

Caracterización funcional de la vía miR390/TAS3 durante el desarrollo de raíces laterales y nódulos en la leguminosa modelo *M. truncatula*

RESULTADOS

1. Patrón de expresión de los componentes de la vía miR390/TAS3 asociado al desarrollo de órganos laterales en raíces de *M. truncatula*

1.1. Niveles de acumulación de los componentes de la vía de miR390/TAS3 en raíces y nódulos

El miR390 de *M. truncatula* ha sido descrito previamente por Jagadeeswaran et al. (2009) y anotado en la base de datos del miRBase (Kozomara and Griffiths-jones, 2014). Sin embargo, al realizar un BLASTN utilizando la secuencia madura del miR390 y la base de datos de la secuencia genómica de *M. truncatula* (versión Mt4.0, Tang et al., 2014) identificamos dos *loci*, a los cuales denominamos MIR390a (Medtr4g014400; Jagadeeswaran et al., 2009) y MIR390b (Medtr3g031300), respectivamente. Ambos *loci* dan lugar a precursores de miR390 (pre-miR390a y pre-miR390b. Anexo. Secuencias) con estructuras secundarias de tallo-rulo (*stem-loop*) termodinámicamente estables (Figura 11) según la predicción del *software RNA fold* (Gruber et al., 2008). Estos precursores son procesados para generar los miR390a y miR390b maduros de 21 nts, los cuales son idénticos a nivel de secuencia nucleotídica. Es por ello que, al cuantificar los niveles de miR390 maduro, se cuantifica la suma de los miRNAs provenientes de ambos precursores.

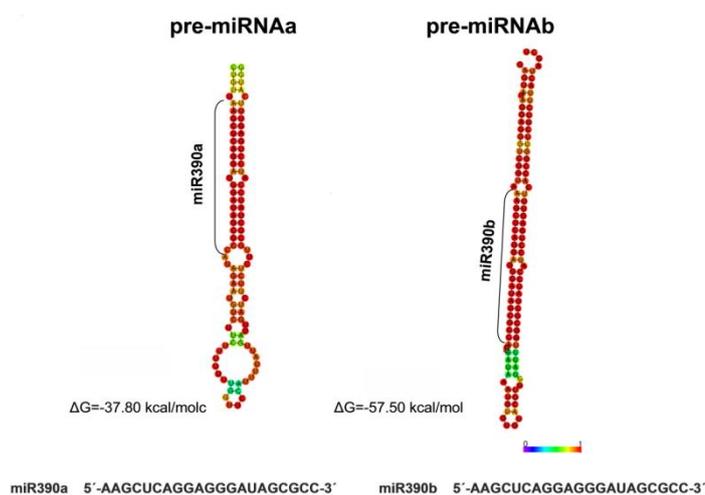


Figura 11. Estructuras de *stem-loop* del pre-miR390a y pre-miR390b. La estructura secundaria de los precursores fue predicha con el *software RNA fold WebSever* (Gruber et al., 2008) usando los parámetros determinados por el sitio. Las estructuras están coloreadas según las probabilidades de apareamiento de las bases. La energía libre mínima (ΔG) de cada estructura y la secuencia de los miR390a y miR390b maduros están indicadas.

Como se mencionó previamente en la introducción, el análisis del reclutamiento selectivo de mRNAs y sRNAs a polirribosomas en etapas tempranas de la interacción *M. truncatula* y *S. meliloti* reveló que los niveles de tasiARFs disminuyen en respuesta al rizobio, tanto en la fracción de RNA total como en su asociación a polirribosomas.

Concomitantemente, los niveles de los transcritos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, los cuales han sido validados experimentalmente como *targets* de los tasiARFs (Jagadeeswaran et al., 2009; Zhou et al., 2013), aumentan en respuesta a la inoculación con el rizobio (Reynoso et al., 2013). Para evaluar si la disminución en la acumulación de tasiARFs es consecuencia directa de una menor acumulación de miR390, se realizó la cuantificación de dicho miRNA. Para ello, se colectó el tejido de raíces de *M. truncatula* inoculadas con agua (*mock*) como control o con *S. meliloti* (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi), se extrajo el RNA total, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante la técnica de *stem-loop* y se realizó la cuantificación de los sRNAs mediante qPCR. Los niveles de miR390 maduro y de los tasiARFs fueron significativamente menores (aproximadamente 80 % y 60 %, respectivamente) en las raíces inoculadas con el rizobio que en aquellas inoculadas con agua (Figura 12 A). También, a partir del mismo RNA total obtenido, se realizó la síntesis de la primera hebra de cDNA utilizando el oligonucleótido dT₁₅ para cuantificar los niveles de acumulación de los transcritos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Además del *locus* de *ARF4* de *M. truncatula* ya conocido, Zhou y colaboradores (2013) identificaron otro gen con un alto porcentaje de identidad a *ARF4*, el cual también posee los sitios *targets* de tasiARFs. Estos dos genes fueron designados *ARF4a* y *ARF4b* (Zhou et al., 2013). Al medir los niveles de *ARF4* se cuantifica entonces la suma de los RNAs proveniente de ambos transcritos. Contrariamente a lo observado para el miR390 y los tasiARFs, los niveles de los transcritos *TAS3* (*target* del miR390) y de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* (*targets* de los tasiARFs) fueron significativamente mayores en las raíces inoculadas por 48 horas con *S. meliloti* respecto de las raíces inoculadas con agua (Figura 12 B).

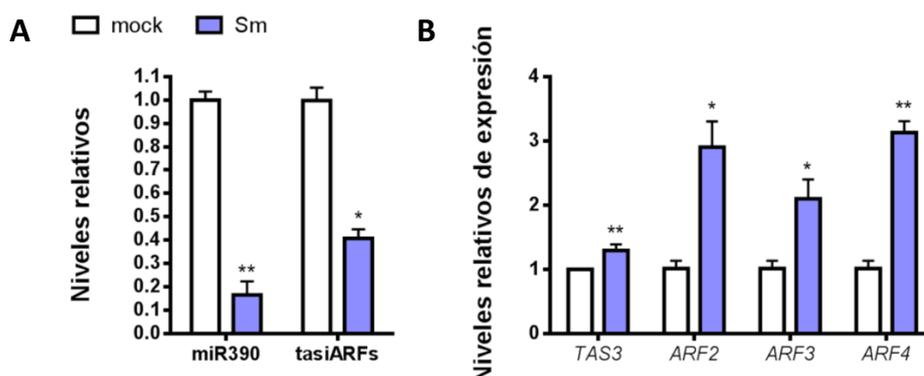


Figura 12. Análisis de los niveles de acumulación de los componentes de la vía de miR390/TAS3 en raíces de *M. truncatula* en etapas tempranas de la interacción con *S. meliloti*. A. Niveles de acumulación del miR390 maduro y tasiARFs cuantificados mediante *stem-loop* RT-qPCR y B. Niveles de acumulación de los transcritos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* cuantificados mediante RT-qPCR en raíces de *M. truncatula* inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a 48 horas post-inoculación. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de tres réplicas biológicas independientes. Los niveles de miR390 y tasiARFs fueron normalizados por los niveles del pequeño RNA *U6* y los niveles de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* fueron normalizados por los niveles del transcripto de Histona 3 *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control *mock*. Los asteriscos indican que los valores de las muestras Sm son significativamente diferentes de las muestras *mock* en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**).

Con el fin de estudiar el patrón de acumulación de los componentes de la vía de miR390/TAS3 en estadios más avanzados de la asociación simbiótica, se realizó la cuantificación de miR390, tasiARFs y sus transcritos *targets* sobre raíces no inoculadas de 7 días post-germinación, nódulos inmaduros de 10 días post-inoculación (dpi) y nódulos maduros de 21 dpi. Los niveles de miR390, TAS3 y tasiARFs fueron mayores en nódulos de 10 dpi respecto a las raíces no inoculadas y a los nódulos de 21 dpi (Figura 13 A-B); mientras que los niveles de los transcritos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* fueron significativamente menores en nódulos de 10 dpi en comparación con las raíces no inoculadas. A su vez, se observó una menor acumulación de los niveles de los transcritos *ARF* en los nódulos de 21 dpi respecto a las raíces no inoculadas, aunque la diferencia sólo fue significativa en el caso de *ARF3* (Figura 13 B).

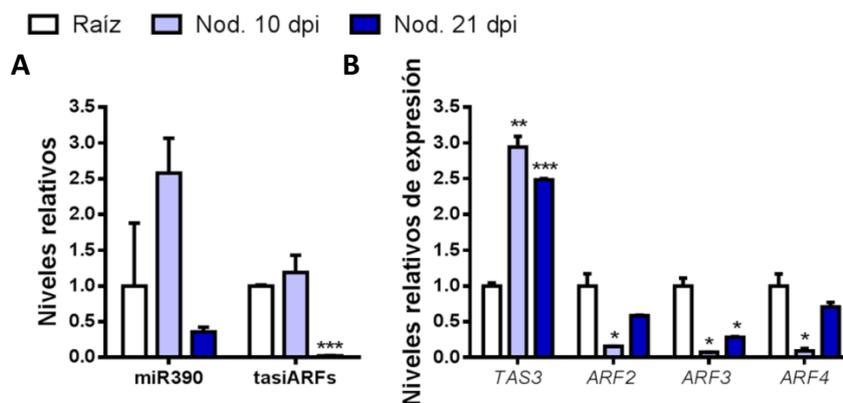


Figura 13. Análisis de los niveles de acumulación de los componentes de la vía de miR390/TAS3 en raíces y nódulos de *M. truncatula*. **A.** Niveles de acumulación del miR390 maduro y tasiARFs cuantificados mediante *stem-loop* RT-qPCR y **B.** niveles de acumulación de los transcritos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* cuantificados mediante RT-qPCR en raíces de 7 días post-germinación y nódulos de 10 y 21 dpi. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de tres replicas biológicas independientes. Los niveles de miR390 y tasiARFs fueron normalizados por los niveles del RNA pequeño *U6* y los niveles de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la muestra de raíz sin inocular. Los asteriscos indican que los valores de las muestras de nódulos son significativamente diferentes de las muestras de raíz en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,001$ (***)).

Estos resultados son consistentes con los datos de secuenciación masiva (RNA-seq) de raíces de *M. truncatula* y nódulos de 10 dpi descriptos por Roux y colaboradores (2014) (Figura 14 A). Por otro lado, el análisis de los niveles de los transcritos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* en diferentes zonas del nódulo de 15 dpi obtenidas por microdissección láser (Roux et al., 2014) reveló un enriquecimiento de estos transcritos en la zona meristemática del nódulo y en menor medida en la zona distal de infección. *ARF4a* mostró además una alta acumulación de sus niveles en la zona proximal de infección, mientras que *ARF4b* también se acumula en la zona intermedia (Figura 14 B).

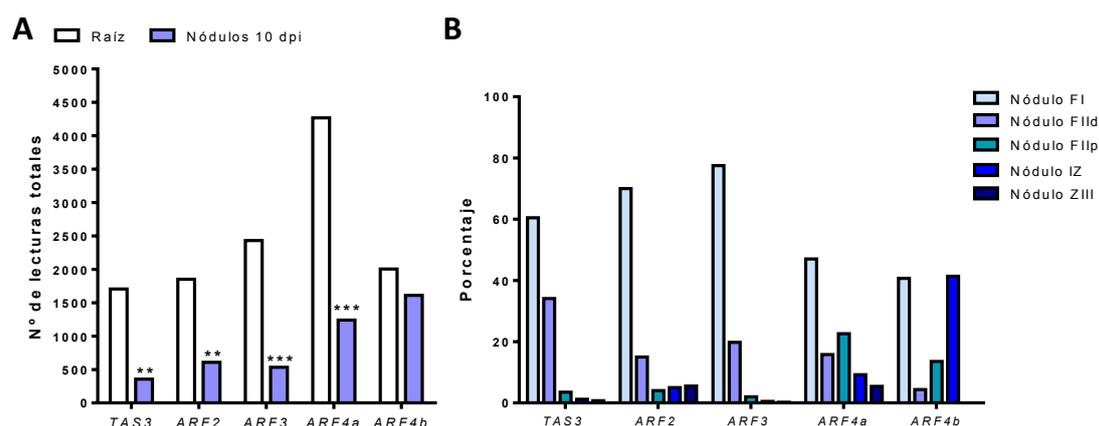


Figura 14. Niveles de acumulación de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* en raíces y nódulos de *M. truncatula*. A. Acumulación de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* en raíces y nódulos 10 dpi con *S. meliloti* 1021 obtenidos mediante RNA-Seq. Los datos corresponden al número de lecturas totales y los asteriscos muestran que los valores de la muestra de nódulos son diferentes de los valores de la muestra de raíces en un *test t-Student* no apareado de dos colas con un $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). **B.** Acumulación de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* en las diferentes zonas del nódulo de 15 dpi. Los datos representan el porcentaje de enriquecimiento de los niveles de los transcritos en las diferentes zonas del nódulo. **FI** (fracción I): zona I o meristemática. **FIId** (fracción II distal) y **FIIf** (fracción II proximal): corresponden a la zona II o de infección dividida en distal (más próxima a FI) y proximal (más próxima a IZ). **IZ**: zona II-III o intermedia. **ZIII**: zona III o de fijación de N_2 . Los datos fueron obtenidos de (Roux et al., 2014).

En resumen, los resultados del análisis de los niveles de acumulación de los componentes de la vía *miR390/TAS3* indican que esta vía sería reprimida en etapas tempranas (48 hpi) de la interacción *M. truncatula-S. meliloti*, liberando la represión post-transcripcional de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Sin embargo, una vez que se forma el nódulo (10 dpi), los mayores niveles de *miR390* y *tasiARFs* contribuirán a regular negativamente la expresión de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. A su vez, en nódulos maduros (15 dpi) la acumulación de los transcritos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4a* estaría restringida a la zona meristemática y de infección del nódulo.

1.2. Análisis de la expresión espacio-temporal de los genes de la vía *miR390/TAS3* en raíces de *M. truncatula*

Con el objetivo de estudiar la expresión espacio-temporal de los genes de la vía *miR390/TAS3* se realizaron fusiones transcripcionales de los promotores del pre-*miR390a*, pre-*miR390b*, *TAS3*, *ARF3* y *ARF4a* al gen reportero *uidA*, también referido como gen *gus* dado que codifica la proteína β -glucuronidasa (GUS), y al gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*). Para ello se amplificaron mediante PCR las regiones genómicas aguas arriba de los pre-*miR390a* y pre-*miR390b* (1.568 nts y 1.492 nts, respectivamente) y las regiones genómicas aguas arriba al codón de inicio de la traducción de los genes *TAS3*, *ARF3* y *ARF4a* (1.980 nts, 1.958 nts y 1.816 nts, respectivamente) utilizando como molde DNA genómico (gDNA) de *M. truncatula*. Los fragmentos de los promotores se introdujeron, mediante la tecnología *Gateway* (Invitrogen), en el vector binario pKGWFS7,0 (Karimi et al., 2002). Este vector

contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina bajo el promotor *nos* (nopalina sintasa) para la selección de las raíces transgénicas. Luego, las construcciones se introdujeron en las raíces de *M. truncatula* mediante la transformación mediada por *A. rhizogenes* (Chabaud et al., 2006). Esta transformación permite generar plantas compuestas que consisten en una parte aérea salvaje con raíces transgénicas. Una vez obtenidas las plantas compuestas se realizó la tinción histoquímica para detectar la actividad de la proteína GUS sobre las raíces transformadas con las construcciones de cada uno de los promotores. En las raíces *pMIR390a* se observó actividad de GUS en el tejido vascular de las raíces principales (RPs) y raíces laterales (RLs), así como también en el meristema y los primordios de las RLs (Figura 15 A-F). El corte transversal de la RP demostró que *pMIR390a* se encuentra activo en los tejidos del periciclo, floema y xilema (Figura B-C). Por otro lado, en las raíces *pMIR390b* se observó actividad GUS en la vasculatura de las RPs (Figura 15 G), particularmente en el periciclo (Figura 15 H-I) y en la vasculatura de las RLs (Figura 15 J), pero no en el meristema de las RLs. No se observó actividad GUS en el primordio de las RLs de *pMIR390b* (Figura 15 K), pero una vez formado el tejido vascular se observó actividad del promotor *miR390b* de en la vasculatura (Figura 15 L).

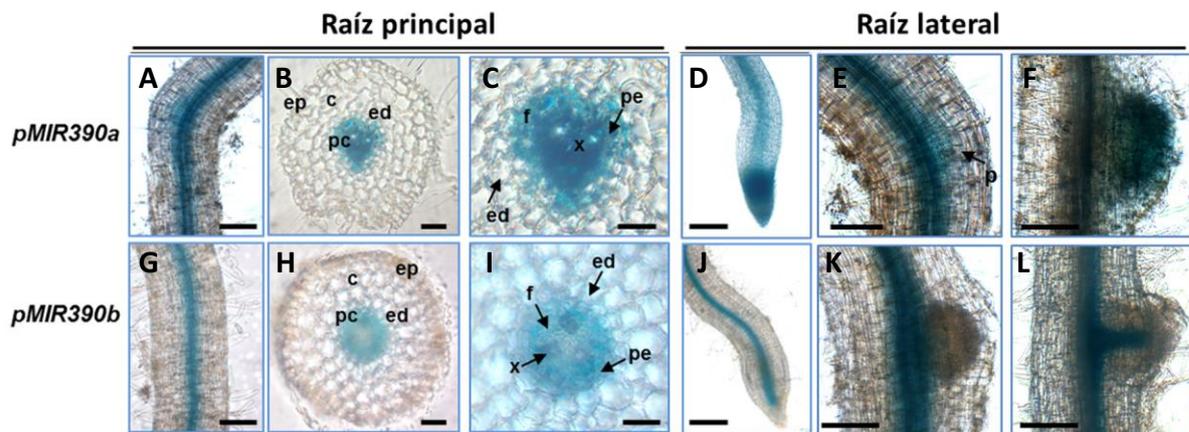


Figura 15. Expresión específica de tejido de los genes *MIR390a* y *MIR390b* en raíces de *M. truncatula*. A y G. Actividad GUS en las raíces principales de *M. truncatula* transformadas con la construcción *pMIR390a:GUS-GFP* (*pMIR390a*) (A) o con *pMIR390b:GUS-GFP* (*pMIR390b*) (G). B y H. Cortes transversales de las raíces principales *pMIR390a* (B) y *pMIR390b* (H). C y I. Amplificación de B y H, respectivamente. D y J. Actividad GUS en las raíces laterales de *M. truncatula* transformadas con la construcción *pMIR390a* (D) o con *pMIR390b* (J). E, F, K y L. Actividad GUS en los primordios de las raíces laterales de *pMIR390a* (E-F) y *pMIR390b* (K-L) ep: epidermis. c: córtex. ed: endodermis. pc: periciclo. f: floema. x: xilema. p: primordio. Barras de escala: 100 µm en A, D, E, F, G, J, K y L, 50 µm en B y H, 25 µm en C y I.

Se analizó la expresión en las raíces de *M. truncatula* de dos *targets* de los tasiARFs, los factores de transcripción *ARF3* y *ARF4a*. La tinción histoquímica de las raíces *pARF3* demostró que el promotor *ARF3* es activo en la zona de diferenciación de la RP y a lo largo de las RLs (Figura 16 A), mientras que el promotor *ARF4a* es activo en las diferentes zonas de la RP y en las RLs, particularmente se observó actividad GUS en la zona meristemática de las RLs (Figura

16 H). Los cortes longitudinales de la RPs demostraron que los promotores de *ARF3* y *ARF4a* se encuentran activos en los primordios de las RLs (Figura 16 B, C, I y J). A su vez se observó expresión de *gfp* en la vasculatura del primordio de la RL emergente en las raíces *pARF3*. Tanto en las RPs como en las RLs de *pARF3* y *pARF4a* se detectó fluorescencia de la proteína GFP en el tejido vascular (Figura 16 D, E, K y L) y en los meristemas apicales (Figura 16 F, G, M y N) aunque *pARF3* demostró fluorescencia GFP de menor intensidad en comparación con *pARF4a*.

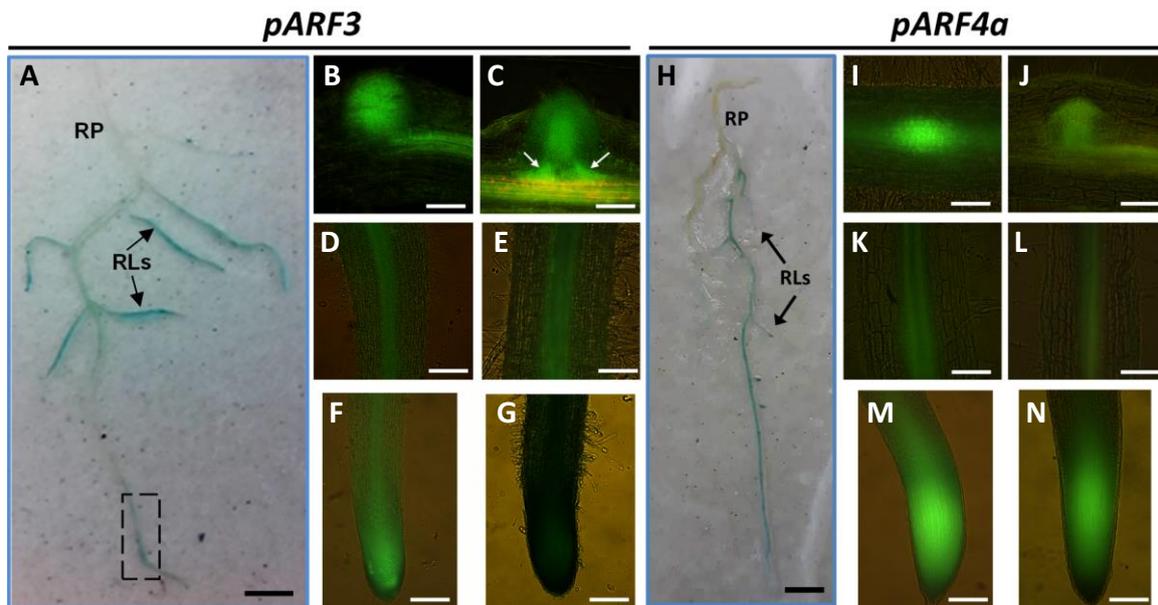


Figura 16. Expresión específica de tejido de los genes *ARF3* y *ARF4a* en raíces de *M. truncatula*. Actividad GUS en raíces de *M. truncatula* transformadas con la construcción *pARF3:GUS-GFP* (*pARF3*, **A**) y *pARF4a:GUS-GFP* (*pARF4a*, **H**). En **A** El rectángulo punteado corresponde a la zona de elongación de la raíz principal. **RP**: raíz principal. **RLs**: raíces laterales. Expresión del gen reportero *gfp* en los primordios de las RLs de *pARF3* (**B-C**) y *pARF4a* (**I-J**) en la vasculatura de las RPs de *pARF3* (**D**) y *pARF4a* (**K**) y de las RLs *pARF3* (**E**) y *pARF4a* (**L**) y en los meristemas apicales de las RPs de *pARF3* (**F**) y *pARF4a* (**M**) y las RLs de *pARF3* (**G**) y *pARF4a* (**N**). Las flechas en **C** indican la vasculatura. Barras de escala: 1 cm en **A** y **H** y 100 μ m en **B** a **G** y de **I** a **N**.

Estos resultados demuestran un solapamiento de la expresión de los genes precursores *MIR390a*, *MI3390b*, *ARF3* y *ARF4a* en el tejido vascular de las RPs y RLs de *M. truncatula*. Consistentemente con lo reportado por Marin y colaboradores (2010) en *A. thaliana*, los promotores *ARF3* y *ARF4* se encuentran activos en el primordio de las RLs. Por otra parte, la actividad de los promotores de *MIR390a*, *ARF3* y *ARF4a* se activa en la zona meristemática de las RLs, por lo cual esta vía podría tener una función en el mantenimiento del meristema de las RLs.

1.3. Expresión espacial y temporal de los genes de la vía miR390/TAS3 durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno en raíces y nódulos de *M. truncatula*

Con el fin de analizar la expresión de los genes de la vía miR390/TAS3 durante la interacción de *M. truncatula* con *S. meliloti* se inocularon las raíces transgénicas con una cepa de *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína fluorescente roja RFP (Tian et al., 2012). La fluorescencia emitida por la proteína RFP (detección de la bacteria) y por la GFP (detección de la actividad del promotor) fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal a diferentes tiempos luego de la inoculación. La actividad del *pMIR390a* fue detectada sólo en estadios avanzados de la interacción; más específicamente, en nódulos de 21 dpi se observó la activación de promotor en el tejido vascular (Figura 17, panel superior). Por otra parte, la actividad del *pMIR390b* fue detectada en etapas tempranas de la infección. A los 6 dpi, estadio en el cual los ITs se encuentran ramificados alcanzando las células en división del córtex; se observó una fuerte actividad del promotor en los pelos radicales infectados, en las células epidérmicas adyacentes al sitio de infección y en las células corticales en división cercanas al IT. En nódulos de 10 y 21 dpi se detectó la actividad del promotor de *MIR390b* en las células que están siendo alcanzadas por los ITs en la zona de infección del nódulo y en las células no infectadas de la zona de fijación; sin embargo, no se detectó actividad del *pMIR390b* en las células completamente infectadas (Figura 17, panel medio). Al igual que miR390b, se observó la activación de la expresión de *TAS3* en las células que están siendo infectadas y en las células no infectadas de la zona de fijación de N₂ en nódulos de 10 y 21 dpi. No se detectó actividad del promotor de *TAS3* en aquellas células de la zona de fijación que han sido completamente ocupadas por el rizobio (Figura 17, panel inferior).

Para determinar si la expresión de los pre-miR390a y pre-miR390b se encuentra restringida a una zona particular del nódulo maduro se realizó una tinción histoquímica de GUS en nódulos *pMIR390a*, *pMIR390b* y *pTAS3* de 28 dpi seguido por cortes longitudinales. La observación microscópica de los cortes mostró que la expresión de *pMIR390a* se activa en la zona apical del nódulo, incluyendo la zona meristemática y la zona de infección distal; mientras que la actividad del *pMIR390b* se encontró restringida a la zona meristemática del nódulo.

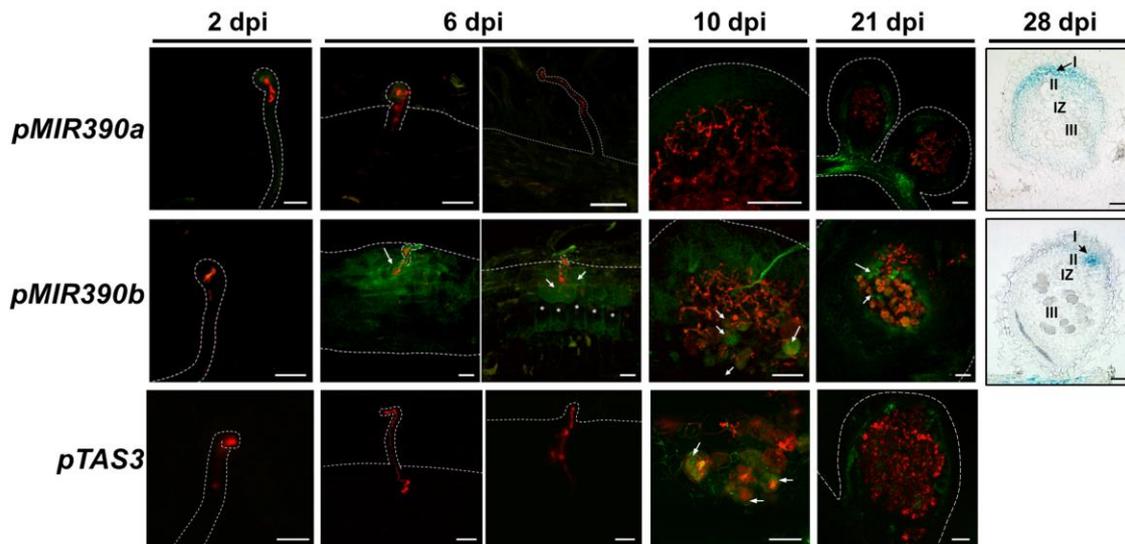


Figura 17. Expresión específica de tejido de los genes *MIR390a*, *MIR390b* y *TAS3* en la interacción simbiótica *M. truncatula*-*S. meliloti*. Fluorescencia de la proteína GFP en raíces y nódulos de *pMIR390a*:*GUS-GFP* (*pMIR390a*, paneles superiores), *pMIR390b*:*GUS-GFP* (*pMIR390b*, paneles medios) y *pTAS3*:*GUS-GFP* (*pTAS3*, paneles inferiores) a los 2, 6, 10 y 21 dpi con *S. meliloti* 1021 expresando la proteína fluorescente roja RFP. A la derecha se muestra la actividad GUS en cortes longitudinales de nódulos *pMIR390a* y *pMIR390b* a los 28 dpi. Las flechas blancas indican las células donde están llegando los ITs. Los asteriscos blancos indican las células del córtex en división. Las flechas negras indican la zona meristemática del nódulo (I). II: zona II o de infección. IZ: zona II-III o intermedia. III: zona III o de fijación del N₂. Las líneas punteadas blancas marcan los bordes de las raíces y nódulos. Barras de escala: 50 µm.

Para indagar en la expresión de los *targets* de los tasiARFs, se analizó la expresión específica de tejido de los genes *ARF3* y *ARF4a* utilizando fusiones de los promotores *ARF3* y *ARF4a* a los genes reporteros *gfp* y *uidA*. A tiempos tempranos de la interacción simbiótica (2 y 6 dpi) no se observó fluorescencia emitida por la GFP en las raíces *pARF3*; sin embargo, en nódulos inmaduros de 10 dpi la fluorescencia se encontró en las células no infectadas y en aquellas que están siendo alcanzadas por los ITs (Figura 18. Panel superior). Por otro lado, a los 2 y 6 dpi se observó activación del promotor de *ARF4a* en las células epidérmicas, incluyendo a las células no infectadas y las células que contienen ITs. En nódulos inmaduros de 10 dpi la expresión se encontró en las células donde están llegando los ITs y en las células no infectadas (Figura 18. Panel inferior). La tinción histoquímica de GUS en nódulos *pARF4a* de 28 dpi, permitió determinar que la expresión de los promotores se encuentra en las zonas meristemáticas y de infección.

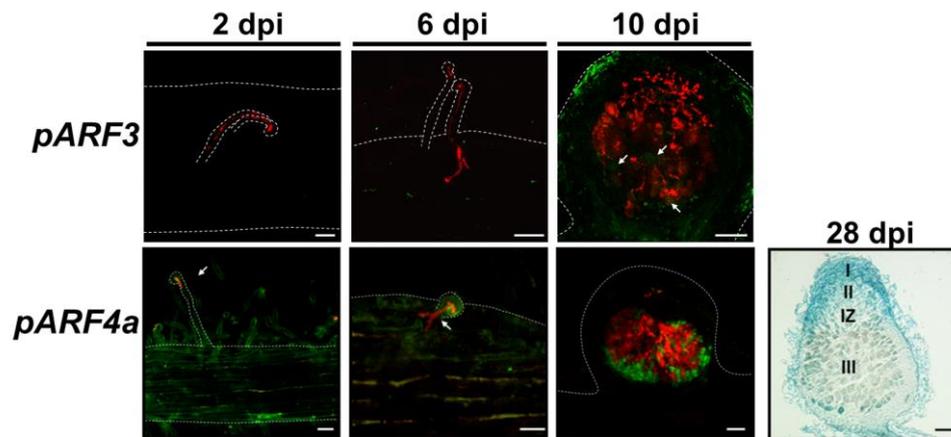


Figura 18. Expresión tejido-específico de los genes *ARF3* y *ARF4a* en la interacción simbiótica *M. truncatula-S. meliloti*. Fluorescencia de la proteína GFP en raíces y nódulos de *pARF3:GUS-GFP* (*pARF3*, panel superior) *pARF4a:GUS-GFP* (*pARF4a*, panel inferior) a los 2, 6 y 10 dpi con *S. meliloti* 1021 expresando la proteína fluorescente roja RFP. Actividad GUS en un corte longitudinal de nódulo *pARF4a* a los 28 dpi. Las flechas blancas indican las células donde están llegando los ITs. I: zona meristemática. II: zona II o de infección. IZ: zona II-III o intermedia. III: zona III o de fijación del N₂. Las líneas punteadas blancas marcan los bordes de las raíces y nódulos. Barras de escala: 50 µm.

Este análisis demuestra que la expresión de *ARF4a*, uno de los *targets* de los tasiARFs, se solapa parcialmente con la expresión de *MIR390b* durante la infección rizobiana. Una vez que se desarrolla el nódulo, se observó que tanto la expresión de *ARF3* y *ARF4a*, *targets* de los tasiARFs, solapa con la expresión de *MIR390b* y *TAS3*, lo cual sugiere que durante el desarrollo del nódulo la vía *miR390/TAS3* se activa en células específicas del nódulo. En nódulos maduros *miR390a/b*, *TAS3* y *ARF4a* podrían tener una función en el mantenimiento del meristema; a su vez, *ARF4a* también podría cumplir un rol en la zona de infección del nódulo maduro.

2. Caracterización funcional de la vía *miR390/TAS3*

2.1. Expresión ectópica del precursor del *miR390b* en raíces de *M. truncatula*

El patrón de expresión espacial y temporal del *miR390b* descrito anteriormente sugiere que este microRNA cumpliría una función en etapas tempranas y/o tardías de la interacción *M. truncatula-S. meliloti*. Por lo tanto, para caracterizar la función del *miR390* en la nodulación se llevó a cabo la sobreexpresión del pre-*miR390b* en raíces de *M. truncatula*. Cabe destacar que la construcción para la expresión ectópica del *miR390* fue generada en el laboratorio del Dr. Martin Crespi y transferida gentilmente a nuestro laboratorio. La construcción se realizó utilizando el vector binario pK7WG2D,1 (Karimi et al., 2002). En este vector, el pre-*miR390b* se encuentra bajo el control del promotor del RNA 35 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). Para la selección de las raíces transformadas el vector

contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina bajo el promotor de *nos* (nopalina sintasa). Además, el vector también posee el gen de la proteína verde fluorescente GFP como marcador reportero que permite visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopía de fluorescencia. La construcción que contiene el pre-miR390b (OX390) y el vector vacío (EV, por *Empty Vector*), utilizado como control, fueron introducidas en las raíces de *M. truncatula* mediante transformación con *A. rhizogenes* (Chabaud et al., 2006).

Con el fin de verificar la sobreexpresión del miR390 se colectaron las raíces transgénicas, se extrajo el RNA total y se llevó a cabo la síntesis de cDNA seguida de la cuantificación del miR390 maduro y los tasiARFs mediante la técnica de *stem-loop* RT-qPCR. Tal como se esperaba, se observó una acumulación del miR390 (5 veces más) y de tasiARFs (4 veces más) en las raíces OX390 respecto a las raíces control EV (Figura 19 A). Adicionalmente, a partir del RNA total obtenido se realizó RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de los transcriptos *targets* del miR390 y los tasiARFs. Consistentemente con la mayor acumulación de miR390 y tasiARFs en las raíces OX390, los niveles relativos de expresión de los transcriptos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* resultaron aproximadamente 50 % menores respecto a las raíces control (Figura 19 B).

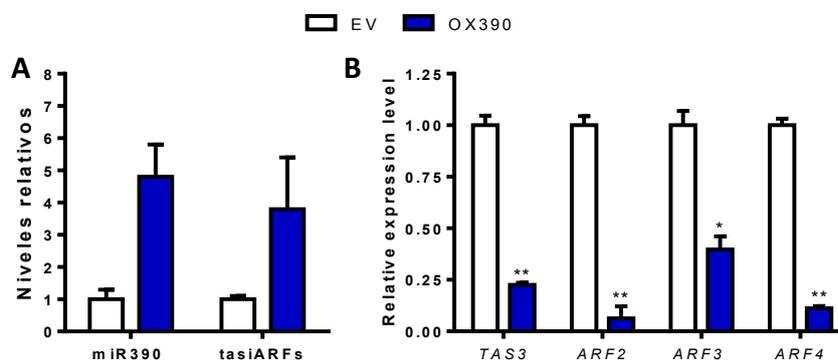


Figura 19. Sobreexpresión ectópica del precursor de miR390b en raíces de *M. truncatula*. **A.** Niveles de acumulación de miR390 maduro y tasiARFs cuantificados mediante *stem-loop* RT-qPCR y **B.** niveles de acumulación de los transcriptos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* cuantificados mediante RT-qPCR en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o con la construcción para la sobreexpresión del pre-miR390b (OX390). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de la media de tres réplicas biológicas independientes. Los niveles de miR390 y tasiARFs fueron normalizados por los niveles del transcripto *U6* y los niveles de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV. Los asteriscos indican que los valores de las muestras OX390 son significativamente diferentes de las muestras EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**).

En conclusión, la sobreexpresión ectópica del pre-miR390b en raíces de *M. truncatula* resulta en la activación de la vía miR390/*TAS3*, generando una acumulación del miR390

maduro y aumentando la producción de los tasiARFs, los cuales actuarían sobre sus transcritos *targets* *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* reduciendo sus niveles de acumulación.

2.2. La expresión ectópica de miR390 regula positivamente la longitud de las raíces laterales

Considerando que miR390 se encuentra altamente conservado en las plantas angiospermas (Cuperus et al., 2011) y los antecedentes reportados en *A. thaliana* acerca de la función de la vía miR390/*TAS3* en el desarrollo de la raíz (Marin et al., 2010), se decidió analizar si la sobreexpresión del miR390 afectaba la arquitectura de la raíz en *M. truncatula*. Se cuantificó la longitud de las RPs y las RLs, y además se determinó el número de RLs emergentes por centímetro de RP (densidad de RLs) en plantas OX390 y EV crecidas durante 15 días en medio Fahraeus suplementado con KNO₃ como fuente de nitrógeno. No se observaron variaciones significativas en la longitud de las RPs, ni en la densidad de RLs en las plantas OX390 respecto a las EV. Sin embargo, la longitud promedio de las RLs en las plantas OX390 fue significativamente mayor que aquella de las plantas EV (Figura 20 A-D). El análisis del fenotipo de los ápices de las raíces laterales mediante microscopía óptica no evidenció diferencias morfológicas entre las plantas OX390 y las plantas control EV.

Como se mencionó en la introducción, la formación y elongación de las RLs es regulada por la acción de las auxinas. Por lo tanto, se investigó la respuesta y la sensibilidad a auxinas de las raíces OX390. Para evaluar la respuesta a auxinas se introdujo la construcción de sobreexpresión del pre-miR390b en raíces de *M. truncatula* que contienen la construcción DR5-mRFP. Las plantas DR5-mRFP poseen el promotor sintético de respuesta a auxinas DR5 fusionado a la proteína monomérica roja fluorescente RFP (Marin et al., 2010). Se observó un incremento en la señalización y/o respuesta de auxina en los ápices de las RLs de OX390 con respecto a las raíces EV (Figura 20 E). Por otro lado, para evaluar la sensibilidad de las raíces OX390 a la aplicación de auxinas exógenas, se traspasaron las plantas EV y OX390 a medio Fahraeus suplementado con nitrógeno como control y con 5 ó 10 µM de IAA. Al cabo de 15 días se determinó el crecimiento de la RP. Las raíces OX390 crecidas en 5 µM y 10 µM de IAA mostraron una mayor inhibición del crecimiento de las RPs con respecto a las EV, incluso no se observó crecimiento de las RPs OX390 en 10 µM de IAA (Figura 20 F), indicando que las raíces OX390 son más sensibles a auxinas exógenas que las raíces EV.

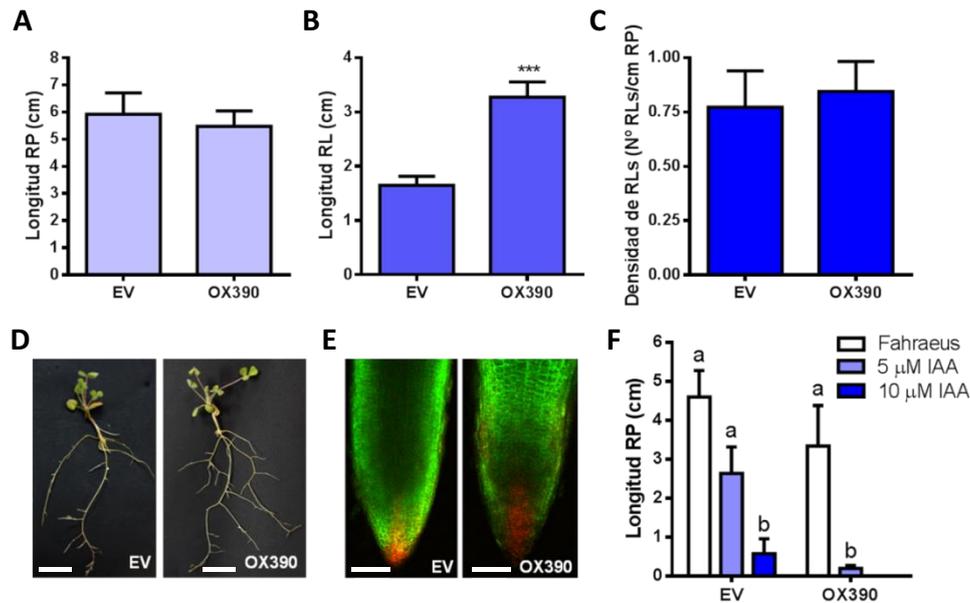


Figura 20. La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b afecta el crecimiento de las raíces laterales. **A-C.** Longitud de las raíces principales (RP) (**A**), raíces laterales (RL) (**B**) y densidad de las RL (**C**) cuantificadas en las plantas compuestas EV y OX390. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Los asteriscos indican que los valores OX390 son significativamente diferentes de los EV en un *test t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,001$ (***) **D.** Fotografías de las plantas compuestas OX390 y EV ilustrando la mayor longitud de las RL OX390. **E.** Imágenes de microscopía confocal de las puntas de las RL de las plantas DR5-mRFP transformadas con las construcciones EV u OX390. GFP es el marcador del vector para la selección de las raíces transgénicas. Las imágenes de los canales fluorescentes verde y rojo están combinadas. **F.** Longitud de las RPs cuantificadas en las plantas OX390 y EV luego del tratamiento con 5 μ M o 10 μ M de IAA o Fahraeus como control. Los datos son representativos de dos réplicas biológicas independientes con más de 10 raíces por ensayo. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar y las letras indican las diferencias significativas entre las muestras en un *test t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$. Barra de escala en **D** 1 cm y **E** 100 μ m.

2.3. La expresión ectópica del miR390 previene la formación de nódulos e hilos de infección

Con el objetivo de estudiar la función de la vía del miR390/*TAS3* en el contexto de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno, se analizó el fenotipo asociado a la nodulación en las raíces de *M. truncatula* que sobreexpresan el pre-miR390b. Para ello, se inocularon las raíces OX390 y EV con una suspensión de *S. meliloti* y se evaluó el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados por raíz transgénica a diferentes tiempos. El porcentaje de plantas OX390 noduladas fue menor con respecto de las plantas control EV a los 6, 9, 13 y 16 dpi, observándose la mayor diferencia a los 16 dpi, tiempo en el cual se registró un 22 % menos de plantas OX390 con nódulos comparado con las plantas EV (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentaje de plantas noduladas

Días post-inoculación	EV	OX390
6	42% (25/59)*	37% (22/60)
9	66% (39/59)	50% (30/60)
13	78% (46/59)	67% (40/60)
16	90% (53/59)	68% (41/60)

*Plantas noduladas/plantas totales

Tabla 1. Porcentaje de plantas noduladas cuyas raíces fueron transformadas con el vector vacío (EV) o que sobreexpresan el pre-miR390 (OX390). El porcentaje fue calculado como el número de plantas con nódulos dividido el número de plantas totales x 100 a los 6, 9, 13 y 16 días post-inoculación con *S. meliloti* 1021.

Asimismo, el número de nódulos formados por raíz resultó significativamente menor en las plantas OX390 respecto de las EV, aproximadamente un 40 % menor a los 13 y 16 dpi (Figura 21). Estos resultados indican que el miR390 actuaría como un regulador negativo en la formación de nódulos en las raíces de *M. truncatula*.

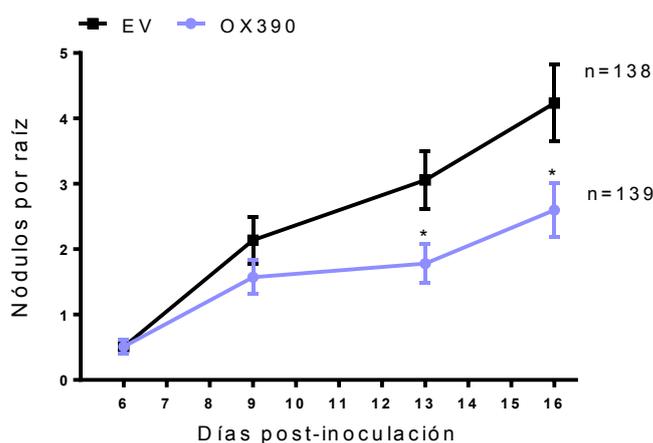


Figura 21. La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b afecta negativamente la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*. Nódulos formados por raíz transgénica en las plantas OX390 y EV a los 6, 9, 13 y 16 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y los asteriscos indican que los valores OX390 son estadísticamente significativos respecto al control EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$. Los datos son representativos de 3 réplicas biológicas independientes. n representa el número de raíces transgénicas incluidas en el análisis.

El análisis morfológico a los 16 dpi mostró que los nódulos OX390 poseen una forma esférica y de color blanco, en contraste con los nódulos EV, los cuales presentan una morfología cilíndrica y color rosa (Figura 22 A-B). También se evaluó el tamaño de los nódulos, observándose una reducción de aproximadamente 27 % en la longitud de los nódulos OX390 respecto a los nódulos EV (Figura 22 C). Los cortes histológicos semifinos de los nódulos OX390 revelaron que los mismos poseen las zonas características de los nódulos indeterminados; sin embargo, en la zona de infección se observó un bajo número de células infectadas con respecto a los nódulos EV (Figura 22 D-E), lo cual sugiere que la vía miR390/TAS3 podría estar involucrada en la regulación de los eventos de infección. Mediante microscopía electrónica se determinó que las células infectadas de los nódulos OX390 poseen simbiosomas normales con

bacteroides diferenciados, por lo cual miR390 no afectaría la diferenciación de las bacterias durante la simbiosis (Figura 22 F-G).

Considerando que la formación y el desarrollo de los nódulos OX390 se encuentra afectado, se analizó como esta alteración influenciaba el desarrollo foliar, como una estimación indirecta de la eficiencia de la fijación de nitrógeno. Se colectaron las partes aéreas de las plantas noduladas OX390 y EV a los 16 dpi, y se incubaron a 80 °C hasta llegar a un peso constante. El peso de la parte aérea de las plantas noduladas OX390 resultó menor que el de las plantas noduladas EV en aproximadamente 20% (Figura 22 H).

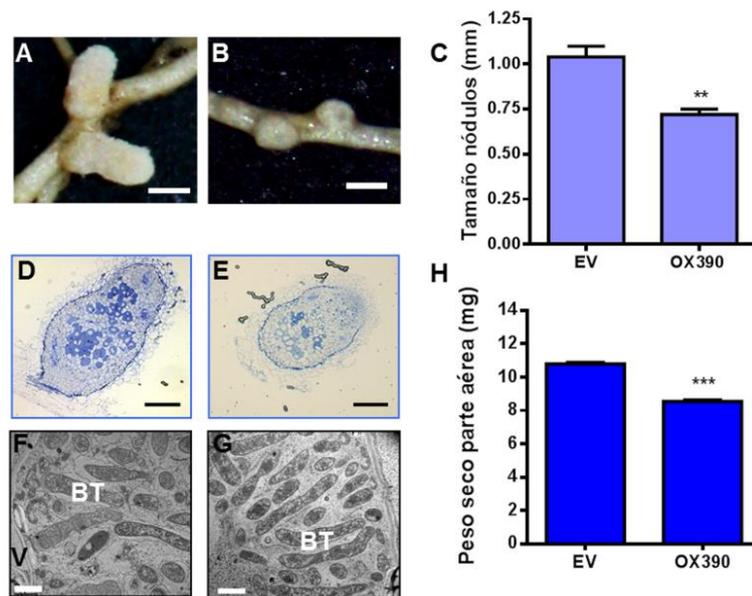


Figura 22. La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b afecta la morfología de los nódulos desarrollados en las raíces de *M. truncatula*. A-B. Fotografías ilustrativas de los nódulos EV (A) y OX390 (B) a los 16 dpi con *S. meliloti* 1021. C. Longitud de los nódulos desarrollados en las raíces OX390 y EV cuantificado a los 16 dpi. D-E. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de cortes semifinos de los nódulos EV (D) y OX390 (E). F-G. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de nódulos EV (F) y OX390 (G). Se indican los bacteroides (BT). H. Peso seco de la parte aérea de las plantas EV y OX390 determinado a los 16 dpi. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 plantas por cada ensayo. Los asteriscos indican que los valores OX390 son significativamente diferentes de los EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Barras de escala: 0,5 mm en A y B, 0,15 en D y E y 2 μ m en F y G.

Considerando que los nódulos formados en raíces OX390 presentan diferencias en el número de células infectadas comparado con el control, se analizaron los eventos de infección rizobiana en etapas tempranas de la interacción. Con este fin se inocularon raíces OX390 y EV con una cepa de *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente RFP y se cuantificaron los ITs por centímetro de raíz transgénica (densidad) mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. Las raíces OX390 mostraron una disminución de aproximadamente 42 % en la densidad de ITs respecto a las raíces control entre los días 5 y 6

post-inoculación (figura 23 A). Además, se analizaron los ITs clasificándolos según su progresión en aquellos que alcanzaban el pelo radical, las células epidérmicas o las células del córtex (Figura 23 B). Cabe señalar que dentro de la clasificación de los hilos que se encuentran en el pelo radical se incluyen las microcolonias y los ITs que comenzaron a elongarse dentro del pelo radical. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ITs en pelo, epidermis o córtex entre las raíces OX390 y EV (Figura 23 C). Este resultado indicaría que la activación de la vía miR390/TAS3 regula negativamente la iniciación de los eventos de infección; sin embargo, la progresión de los ITs no se encuentra alterada.

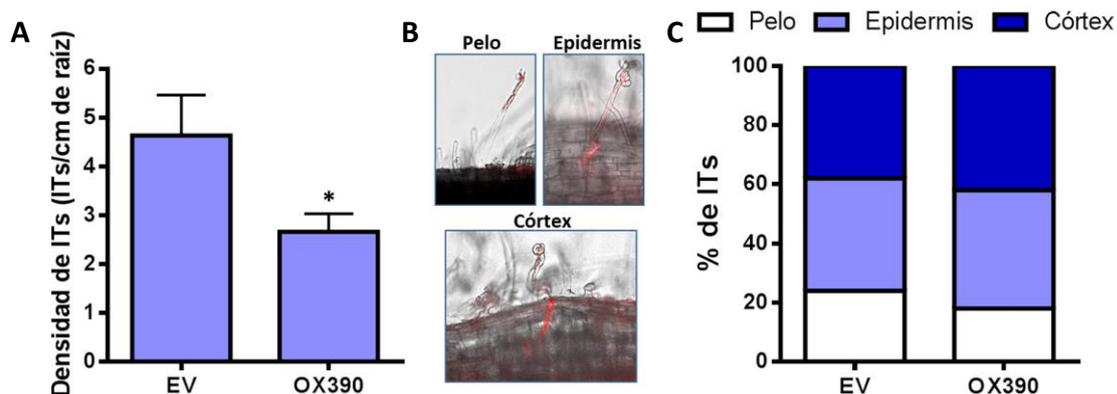


Figura 23. La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b afecta negativamente la iniciación de los eventos de infección. A. Cuantificación de ITs por centímetro de raíz (densidad) en las raíces EV y OX390 a los 5-6 dpi con *S. meliloti* marcado con RFP (Sm RFP) mediante un microscopio de fluorescencia. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 20 raíces por cada ensayo. Los asteriscos indican que los valores OX390 son significativamente diferentes de las EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*). B. Fotografías ilustrativas de la progresión de los ITs dentro de los tejidos de la raíz de *M. truncatula*. C. Porcentaje ITs que alcanzaron en el pelo, epidermis o córtex en las raíces transgénicas EV y OX390 a los 5-6 dpi con Sm RFP. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes.

2.4. Inactivación de la vía miR390/TAS3

Para una mayor comprensión de la función del miR390 durante el desarrollo de los órganos laterales post-embriónicos en la raíz de *M. truncatula* se decidió inactivar la vía de miR390/TAS3. Para ello se utilizaron dos estrategias o aproximaciones experimentales diferentes. Por un lado, se redujo la producción de tasiARFs utilizando la técnica *target mimicry* dirigida contra el miR390 y por otro lado se utilizaron plantas mutantes en el gen *ARGONAUTA7 (AGO7)*, en las cuales la producción de tasiARFs es nula (Zhou et al., 2013). La técnica *target mimicry* tiene como objetivo reducir la acción del miRNA sobre su transcripto *target*. Esta se basa en el mecanismo de inhibición endógeno del miR399 por el transcripto no codificante *IPS1 (Induced by Phosphate Starvation1)*. *IPS1* contiene una secuencia complementaria al miR399 pero con tres nucleótidos adicionales en el sitio de clivaje del

miRNA, generando un *loop-mismatch* que impide el clivaje endonucleolítico del par miR399/*IPS1*. Por lo tanto, *IPS1* secuestra al miR399, impidiendo su acción sobre su *target* (Franco-Zorrilla et al., 2007). La técnica *target mimicry* consiste en sobreexpresar una forma mutada del transcripto *IPS1*, en el cual se reemplaza la secuencia complementaria del miR399 por la secuencia complementaria al miRNA de interés conteniendo un *loop-mismatch*. En algunos casos, además del secuestro del miRNA a estudiar, se ha reportado que se produce la degradación del miRNA cuando se aplica esta técnica (Franco-Zorrilla et al., 2007). La construcción del *target mimicry* para miR399 fue generada en el laboratorio del Dr. Crespi y cedida generosamente a nuestro laboratorio. La construcción se realizó utilizando el vector binario pK7WG2D,1 (Karimi et al., 2002), descrito anteriormente en la sección de sobreexpresión del miR399. Luego, se introdujo la construcción en las raíces de *M. truncatula* mediante la transformación con *A. rhizogenes* (Chabaud et al., 2006). Se seleccionaron las raíces transgénicas y se evaluaron los niveles de miR399 y tasiARFs mediante la técnica *stem-loop* RT-qPCR y los niveles de los transcriptos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* mediante RT-qPCR. Se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de miR399 maduro (74 % menos) y tasiARFs (69 % menos) en las raíces que expresan el *target mimicry* de miR399 (MIM399) respecto a las raíces control (EV) (Figura 24 A). Por otra parte, los niveles de acumulación de los *targets* de los tasiARFs, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* mostraron un aumento del 20 %, 61 % y 56 %, respectivamente (Figura 24 B).

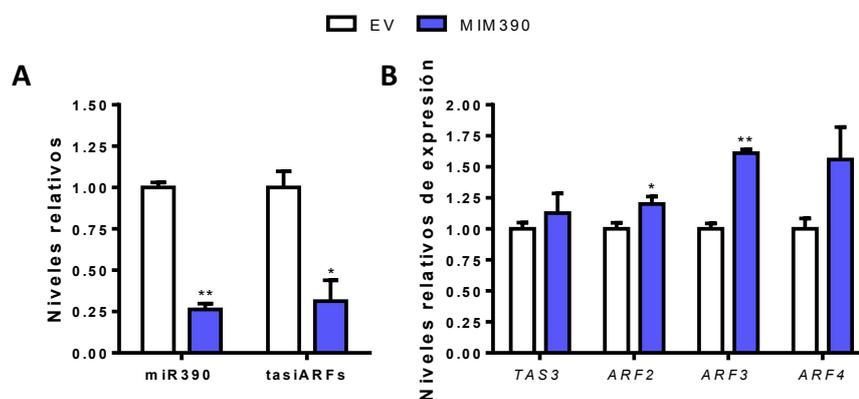


Figura 24. Expresión ectópica de un *target mimicry* de miR399 en raíces de *M. truncatula*.

A. Niveles de acumulación de miR399 maduro y tasiARFs cuantificados mediante la técnica de *stem-loop* RT-qPCR y **B.** Niveles de acumulación de los transcriptos *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* cuantificados mediante RT-qPCR en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o con la construcción para la expresión del *target mimicry* contra miR399 (MIM399). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar y es representativa de dos réplicas biológicas independientes. Los niveles de miR399 y tasiARFs fueron normalizados por los niveles del transcripto *U6* y los niveles de *TAS3*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV. Los asteriscos indican que los valores de las muestras MIM399 son significativamente diferentes de las muestras EV en un *test t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**).

En conclusión, estos resultados permitieron verificar la inactivación de la vía miR390/TAS3 mediante la expresión de un *target mimicry* dirigido contra miR390. A su vez, como había sido reportado previamente para otros miRNAs (Franco-Zorrilla et al., 2007), la expresión del *target mimicry* promueve la degradación de miR390, lo cual también se ve reflejado en la disminución en la producción de tasiARFs y el aumento en los niveles los transcritos *targets ARF2, ARF3 y ARF4*.

La segunda aproximación experimental utilizada para inactivar la vía miR390/TAS3 fue utilizar plantas mutantes *ago7*. Como se describió previamente, la proteína AGO7 es un componente específico de la vía de miR390/TAS3 (Montgomery et al., 2008), en contraste con SGS3, RDR6 y DCL4, los cuales además están involucrados en la biogénesis de otros siRNAs. AGO7 se asocia a miR390 y produce el clivaje del transcripto TAS3 para dar lugar a la producción de tasiARFs. Para conocer el patrón de expresión de AGO7 durante la simbiosis fijadora de nitrógeno se analizaron los datos de microarreglos de DNA disponibles para raíces y nódulos de 4, 10, 14 y 28 dpi Benedito et al. (2008) y los datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) de raíces, nódulos de 10 dpi y las diferentes zonas del nódulo de 15 dpi (Roux et al., 2014). En nódulos de 4, 10 y 14 dpi se observó una mayor acumulación del transcripto de AGO7 en comparación con las raíces, observándose el máximo a los 10 dpi, mientras que en nódulos de 28 dpi los niveles de AGO7 fueron similares a los niveles de la raíz sin inocular (Figura 25 A-B). Además, en nódulos maduros se observó una mayor acumulación de AGO7 en la zona meristemática (Figura 25 B). Estos resultados indican que el patrón de acumulación de AGO7 sigue la misma tendencia que la actividad del promotor de MIR390, lo que resulta consistente con el hecho de que la proteína AGO7 es específica para la unión de miR390 y la producción de tasiARFs. Por otro lado, el análisis de los transcritos SGS3, RDR6 y DCL4 demostró que los mismos están presentes en raíces y nódulos pero exhiben un patrón de acumulación diferente al de los componentes de la vía de miR390/TAS3 (Figura 25 C-D).

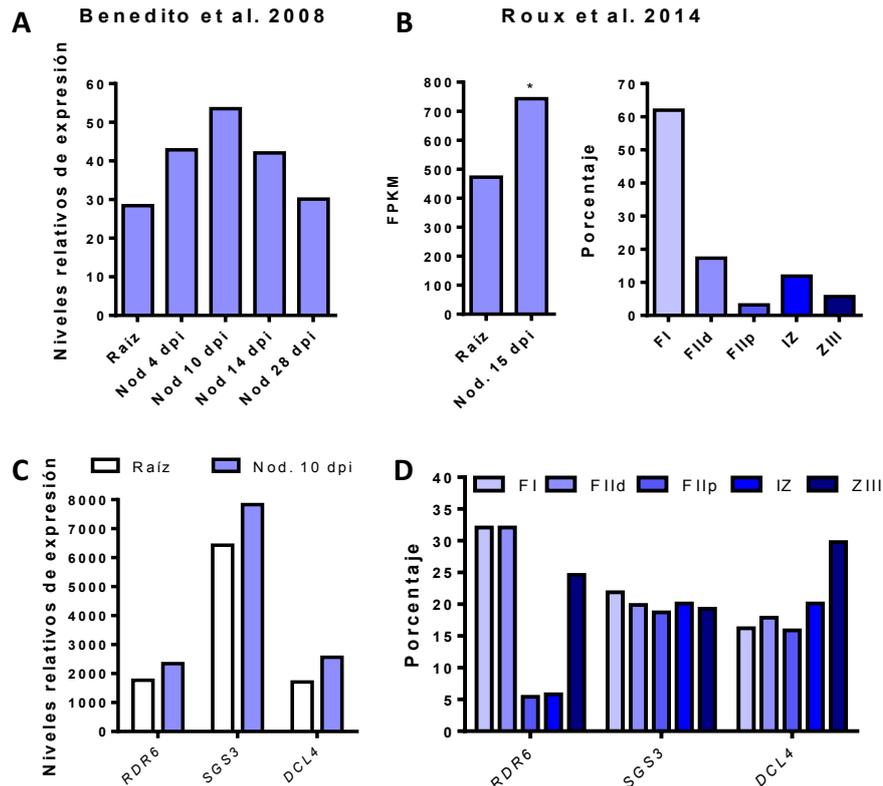


Figura 25. Niveles de acumulación de mRNAs que codifican proteínas involucradas en la biogénesis de tasiARFs en las raíces de *M. truncatula*. A-B. Niveles de acumulación del transcrito *ARGONAUTA7* (*AGO7*) en raíces y nódulos de 4, 10, 14 y 28 días post-inoculación (dpi) obtenidos de los datos de microarreglos (Benedito et al., 2008) (A) y en raíces, nódulos de 10 dpi, y las diferentes zonas de los nódulos de 15 dpi obtenidos de los datos de RNA-seq (Roux et al., 2014) (B). C-D. Niveles de acumulación de los transcritos *RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6* (*RDR6*), *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3* (*SGS3*) y *DICER LIKE4* (*DLC4*) en raíces y nódulos de 10 dpi (C) y en las diferentes zonas de los nódulos de 15 dpi obtenidos de los datos de RNA-seq (Roux et al., 2014) (D). FI: zona meristemática, FIId: zona de infección distal, FIIp: zona de infección proximal, IZ: zona intermedia y ZIII: zona de infección.

Previamente, Zhou y colaboradores (2013) caracterizaron tres líneas mutantes del gen *AGO7* en *M. truncatula* (*ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3*), las cuales poseen niveles nulos de *AGO7* y consecuentemente no producen tasiARFs (Zhou et al., 2013). El gen *AGO7* consta de tres exones y cada línea mutante posee una inserción del transposon *Tnt1* en los diferentes exones (Figura 26 A). Las líneas *ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3* fueron transferidas gentilmente a nuestro laboratorio por la *Samuel Roberts Noble Foundation*. Una vez crecidas las plantas *ago7* y las *wild type* (WT) se verificaron los niveles de *AGO7* mediante RT-PCR semicuantitativa. En las raíces *ago7* homocigotas no se detectaron niveles de expresión del transcrito *AGO7*, mientras que en las raíces WT se observó acumulación de este transcrito (Figura 26 B), indicando que las mismas serían mutantes nulas para *AGO7*. Además, se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de acumulación de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Como se esperaba, las raíces *ago7*, incapaces

de producir tasiARFs, mostraron una mayor acumulación de los transcritos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* respecto a las raíces WT (Figura 26 C).

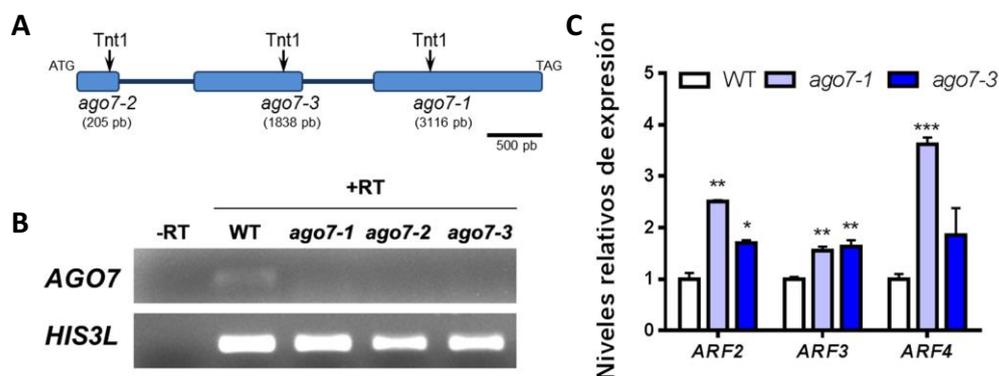


Figura 26. Niveles de acumulación de los transcritos *AGO7*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* en raíces de *M. truncatula* mutantes en el gen *ARGONAUTA7* (*AGO7*). A. Esquema representativo de la estructura del gen *ARGONAUTA7* (*AGO7*). Se muestran los tres exones (rectángulos celestes) y los dos intrones (línea azul). Se señala la posición de la inserción de *Tnt1* en las distintas mutantes *ago7*. B. Niveles de acumulación de *AGO7* e *HISTONA3* (*HIS3L*), utilizado como control de carga, en las raíces de las mutantes *ago7* (*ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3*) y en las raíces *wild type* (WT) cuantificados mediante PCR semicuantitativa de 35 y 25 ciclos, respectivamente. -RT: control negativo de la reacción sin cDNA. C. Niveles de acumulación de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* cuantificados mediante RT-qPCR en las raíces WT, *ago7-1* y *ago7-3*. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar y es representativa de dos réplicas biológicas independientes. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcrito *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control WT. Los asteriscos indican que los valores de las muestras *ago7-1* y *ago7-3* son significativamente diferentes de las muestras WT en un *test t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

2.5. Fenotipo asociado a las raíces en las plantas MIM390 y *ago7*

Para evaluar el posible efecto de la inactivación de la vía miR390/TAS3 sobre la arquitectura de raíz, se crecieron las plantas compuestas MIM390, EV y las plantas mutantes *ago7* y WT en medio Fahraeus suplementado con nitrógeno. Luego de 15 días, se cuantificaron las longitudes de las RPs, RLs y la densidad de RLs (número de RLs/centímetro de RP). No se observaron diferencias significativas en la longitud de las RLs y en la densidad de las RLs en las plantas MIM390 respecto a las plantas control. Sin embargo, la longitud de las RPs MIM390 resultaron significativamente mayores comparadas con las RPs EV (Figura 27 A-C). Contrariamente, las plantas mutantes *ago7* mostraron RPs de menor longitud respecto a las WT (Figura 27 D-F). Cabe destacar que las mutantes *ago7* presentan una morfología muy afectada en diferentes órganos (Zhou et al., 2013), por lo tanto el fenotipo observado en la arquitectura de la raíz puede ser una consecuencia del fenotipo pleiotrópico observado también en la parte aérea de la planta (Figura 27 G).

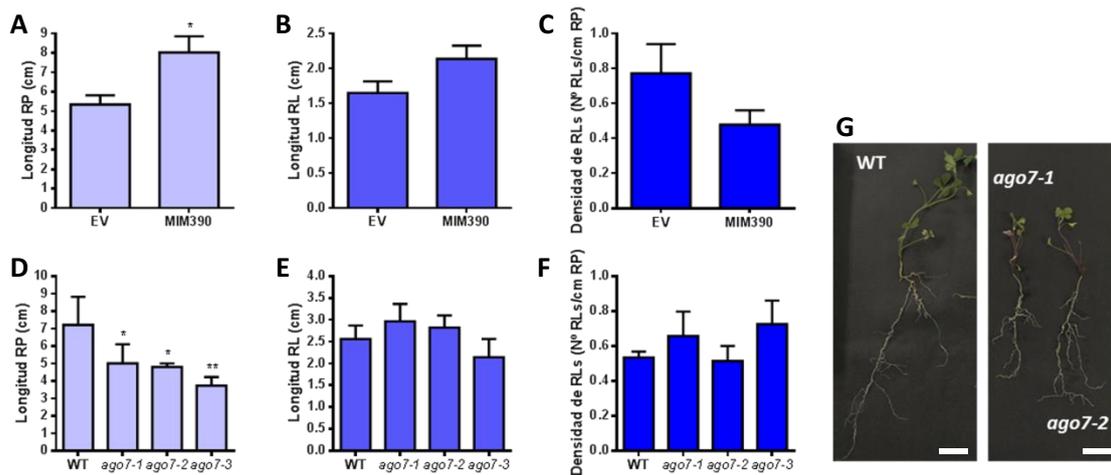


Figura 27. Efecto de la inhibición de la vía miR390/TAS3 sobre la arquitectura de raíces en *M. truncatula* A-C. Longitud de las raíces principales (RP) (A), raíces laterales (RL) (B) y densidad de las RL (C) cuantificadas en las plantas compuestas EV y MIM390. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 raíces transgénicas por cada ensayo. Los asteriscos indican que los valores MIM390 son significativamente diferentes de las raíces EV en un test *t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*). D-F. Longitud de las raíces RP (D), RL (E) y densidad de las RL (F) cuantificadas en las plantas WT y mutantes *ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3*. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de dos réplicas biológicas independientes, con más de 10 plantas por cada ensayo. Los asteriscos indican que los valores de *ago7* son significativamente diferentes de las plantas WT en un test *t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0.01$ (**). G. Fotografías ilustrativas de las plantas WT, *ago7-1* y *ago7-2*. Barras de escala: 1 cm.

2.6. La inactivación de la vía miR390/TAS3 produce un aumento de la formación de nódulos e hilos de infección

Para analizar el efecto asociado a la nodulación al inactivar la vía miR390/TAS3, se cuantificó el número de raíces transgénicas MIM390 y raíces control EV con nódulos y la cantidad de nódulos por raíz a diferentes tiempos luego de la inoculación con *S. meliloti*. El porcentaje de plantas MIM390 noduladas fue mayor a los 6, 9, 13 y 16 dpi con respecto a las plantas control EV; siendo mayor esta diferencia a los 6 dpi, en donde se observó un 31 % más de plantas MIM390 con nódulos en comparación con las plantas EV (Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de plantas noduladas

Días post-inoculación	EV	MIM390
6	42% (25/59) *	73% (23/37)
9	66% (39/59)	81% (30/37)
13	78% (46/59)	86% (32/37)
16	90% (53/59)	95% (35/37)

*Plantas noduladas/plantas totales

Tabla 2. Porcentaje de plantas noduladas cuyas raíces fueron transformadas con el vector vacío (EV) o que sobreexpresan un *target mimicry* de miR390 (MIM390). El porcentaje fue calculado como el número de plantas con nódulos dividido el número de plantas totales x 100 a los 6, 9, 13 y 16 días post-inoculación con *S. meliloti* 1021.

Por otro lado, se observó un aumento en el número de nódulos por raíz en MIM390 a los 6, 9, 13 y 16 dpi respecto al número de nódulos por raíz en EV. Sin embargo, esta diferencia

sólo fue estadísticamente significativa al sexto día post-inoculación (Figura 28 A). Llamativamente, los nódulos desarrollados en las raíces MIM390 se encontraron agrupados en *clusters* a lo largo de la zona de la raíz susceptible a la infección rizobiana. Además, el 40 % de los nódulos MIM390 presentaban varios lóbulos, posiblemente como consecuencia de la formación de múltiples meristemas, mientras que en las plantas EV solamente el 14 % de los nódulos fueron multilobulados (Figura 28 B). A los 16 dpi, los nódulos MIM390 mostraron una morfología elongada y de coloración rosada, característica de los nódulos indeterminados. La observación microscópica de cortes semifinos de nódulos mostró que efectivamente los nódulos MIM390 poseen las zonas características de los nódulos indeterminados y no se encontraron diferencias respecto a los nódulos EV (Figura 28 C). El análisis de las células infectadas en la zona de fijación de los nódulos MIM390, mediante microscopía electrónica, mostró que los simbiosomas son normales y que la diferenciación de los bacteriodes no se encuentra afectada (Figura 28 D). Sin embargo, por más que se observó un aumento del número de nódulos en las raíces MIM390 y que el desarrollo de los nódulos y los bacteriodes fue normal, no se observó diferencia en el peso seco de la parte aérea de las plantas MIM390 con respecto al de las plantas control, lo cual indicaría que no hay diferencias significativas en la fijación de nitrógeno (Figura 28 E).

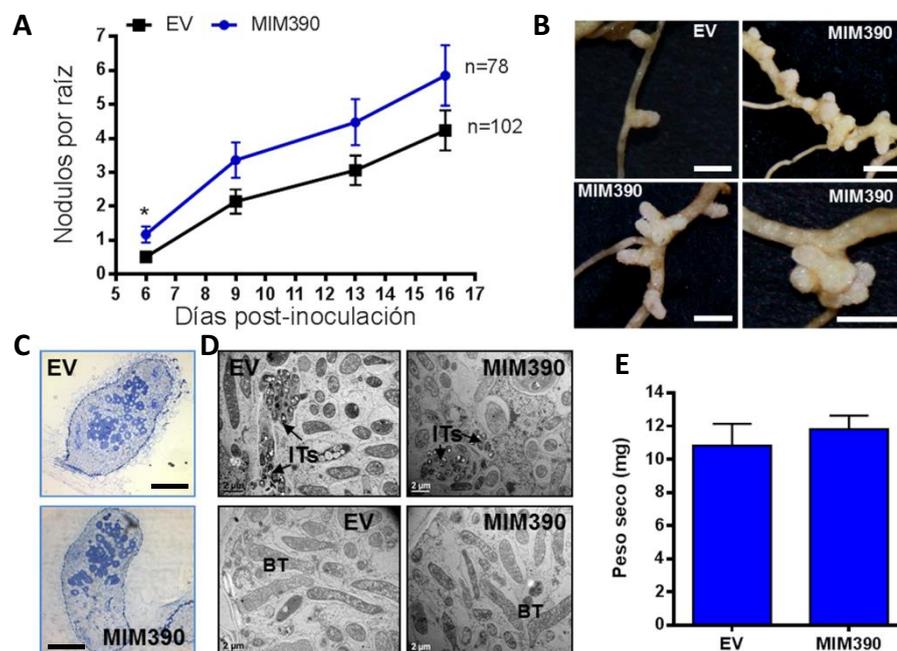


Figura 28. La expresión del *target mimicry* de miR390 promueve la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula* y altera su distribución espacial. **A.** Nódulos formados por raíz transgénica en las plantas MIM390 y EV a los 6, 9, 13 y 16 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y el asterisco indica que los valores MIM390 son estadísticamente significativos respecto al control EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$. Los datos son representativos de 3 réplicas biológicas independientes. *n* representa el número de raíces transgénicas incluidas en el análisis. **B.** Fotografías ilustrativas de los nódulos EV y MIM390 a los 16 dpi. **C.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica de cortes semifinos de los nódulos EV y MIM390. **D.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de cortes ultra finos de nódulos EV y MIM390. **E.** Peso seco de la parte aérea de las plantas EV y MIM390 determinado a los 16 dpi. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 plantas por cada ensayo. Barras de escala: 1 cm en **B**, 0,15 mm en **C** y 2 μ m en **D**.

Consistentemente con el fenotipo observado en las raíces MIM390, las mutantes *ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3* mostraron un aumento en el número de nódulos por planta comparado con las plantas WT y los nódulos se desarrollaron en *clusters* a lo largo de la zona susceptible a la infección. Además, se observó una alta proporción de nódulos multilobulados en las mutantes *ago7* con respecto a los nódulos WT (53 % versus 25 %, respectivamente) (Figura 29 A-B). Al igual que los nódulos MIM390, los nódulos *ago7* mostraron una morfología característica de los nódulos indeterminados y mediante microscopía electrónica se observaron simbiosomas normales con bacteroides diferenciados en las células correspondientes a la zona de infección del nódulo (Figura 29 C).

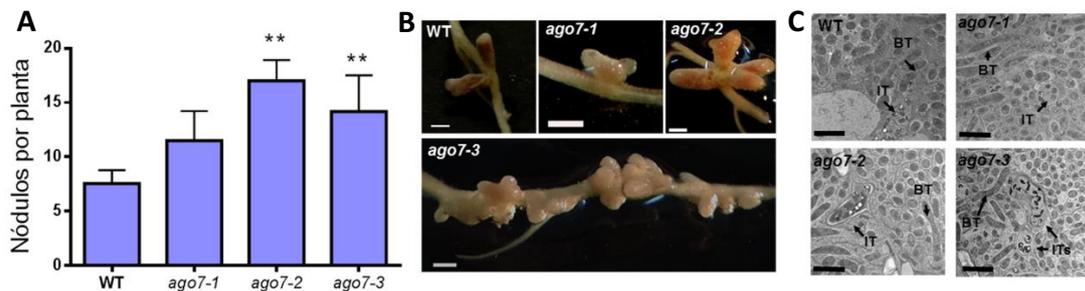


Figura 29. Las mutaciones en el gen *AGO7* producen un aumento en la formación de nódulos y alteran su distribución espacial. **A.** Número de nódulos formados en las líneas mutantes del gen *ARGONAUTA7* (*ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3*) y en las plantas *wild type* (WT) cuantificados a los 28 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y los asteriscos indican que los valores *ago7-2* y *ago7-3* son estadísticamente significativos respecto al WT en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,01$. Los datos son representativos de 2 réplicas biológicas independientes con al menos 6 plantas por condición. **B.** Fotografías ilustrativas de los nódulos *ago7-1*, *ago7-2*, *ago7-3* y WT a los 28 dpi. **C.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de nódulos *ago7-1*, *ago7-2*, *ago7-3* y WT. BT: bacteroides, IT: hilos de infección. Barras de escala: 5 mm en **B** y 2 μ m en **C**.

El análisis de estos resultados indica que la inactivación de la vía *miR390/TAS3*, ya sea mediante la expresión de un *target mimicry* de *miR390* o la mutación del gen *AGO7*, produce un aumento en la formación de nódulos en las raíces de *M. truncatula*. Los nódulos desarrollados en las plantas MIM390 y *ago7* presentan una morfología y una distribución espacial alteradas; sin embargo, poseen simbiosomas normales con bacteroides diferenciados.

Teniendo en cuenta que la formación de nódulos se encuentra aumentada en las raíces MIM390 y en las plantas *ago7*, se prosiguió con el estudio de los eventos de infección y la progresión de los ITs en dichas plantas. Con este fin, se inocularon raíces MIM390, EV, WT, *ago7-1* y *ago7-3* con la cepa de *S. meliloti* que expresa RFP. Luego de 6 días, se cuantificaron y clasificaron los ITs, como se describió anteriormente para las plantas OX390. Tanto las raíces MIM390 como las raíces *ago7-1* y *ago7-3* mostraron un aumento en la densidad de ITs, de más del 30 %, con respecto a las raíces control, EV o WT (Figura 30 A-C). En contraposición, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la progresión de los ITs a través de las distintas capas celulares (Figura 30 B-D). Estos resultados indican que la inhibición de la vía *miR390/TAS3* promueve la iniciación de los eventos de infección sin afectar la progresión de

los ITs hacia las células corticales en división que van a dar lugar a la formación del primordio del nódulo.

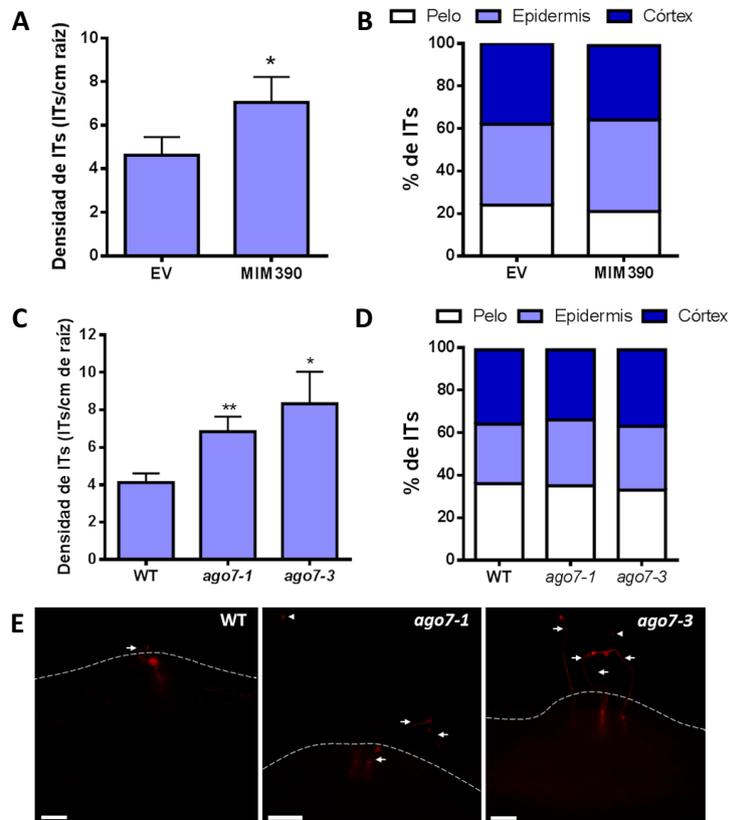


Figura 30. La inactivación de la vía miR390/TAS3 promueve un aumento de los eventos de infección en las raíces de *M. truncatula*. **A.** Cuantificación de hilos de infección (ITs) por centímetro de raíz (densidad) en las raíces transgénicas EV y MIM390 y **D.** en las raíces WT, *ago7-1* y *ago7-3* a los 6 dpi con *S. meliloti* RFP mediante un microscopio de fluorescencia. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 20 raíces para el ensayo de MIM390 y con más de 14 raíces para el ensayo de las mutantes del gen *AGO7*. Los asteriscos indican que los valores MIM390 o *ago7-1* y *ago7-3* son significativamente diferentes de las EV o las WT, respectivamente, en un *test* t-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**). **B.** Porcentaje de ITs que alcanzaron el pelo, epidermis o córtex en las raíces EV y MIM390 y **C.** en las raíces WT, *ago7-1* y *ago7-3* a los 6 dpi con *S. meliloti* RFP. Los datos son representativos de tres réplicas biológicas independientes. **E.** Fotografías ilustrativas de la densidad de ITs y la progresión dentro de los tejidos de la raíz de *M. truncatula* WT y las mutantes *ago7-1* y *ago7-3*. Barras de escala 50 μ m.

3. Impacto de la vía miR390/TAS3 sobre la señalización molecular de la interacción simbiótica

3.1. La vía miR390/TAS3 afecta la inducción de los factores de transcripción *NSP1* y *NSP2* en respuesta a *S. meliloti*

Con el objetivo de explorar si la vía de miR390/TAS3 actúa como un módulo regulador de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno entre *M. truncatula* y *S. meliloti* mediante la regulación de genes involucrados en la infección rizobiana y/u organogénesis del nódulo, se

analizó la expresión de un set de genes marcadores de nodulación. Entre los genes seleccionados se encuentran *NF-YA1* (*Nuclear Factor Y-A1*, Soyano et al., 2013), *NIN* (*Nodule Inception*, Marsh et al., 2007), *ENOD11* (*Early Nodulation gene11*, Boisson-dernier et al., 2005), *ERN1* (*Ethylene Response Factor/APETALA2*, Andriankaja et al., 2007; Middleton et al., 2007; Cerri et al., 2012), *NSP1* (*Nodulation Signaling Pathway 1*, Smit et al., 2005), *NSP2* (Kaló et al., 2005), *CRE1* (*Cytokinin Receptor1*, Gonzalez-Rizzo et al., 2006) y *ENOD40* (*Early Nodulation gene40*, Crespi et al., 1994; Charon et al., 1997). La cuantificación de los niveles de acumulación del set de genes se realizó mediante RT-qPCR en las raíces que sobreexpresan el precursor de miR390b (OX390) y en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) como control, inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* (Sm) a las 48 hpi (Figura 31). La inducción de los transcritos *NIN*, *NF-YA1* y *CRE1* en respuesta al rizobio no demostró estar significativamente afectada en las raíces OX390 en comparación con las raíces control EV. Por otro lado, los niveles de expresión de *ERN1* y *ENOD40* fueron estadísticamente mayores en las raíces OX390 *mock* con respecto a las raíces control en la misma condición. Sin embargo, en respuesta a la inoculación con *S. meliloti* se observó que los niveles de *ERN1* y *ENOD40* fueron similares en las raíces OX390 y EV. La acumulación del transcrito *ENOD11* fue menor en las raíces OX390 en comparación con las raíces control EV luego de 48 hpi con el rizobio. Llamativamente, no se observó inducción en la expresión de los genes *NSP1* y *NSP2* en respuesta al rizobio en las raíces OX390. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de miR390 podría estar controlando de manera indirecta la inducción de *ENOD11*, *NSP1* y *NSP2* en respuesta al rizobio.

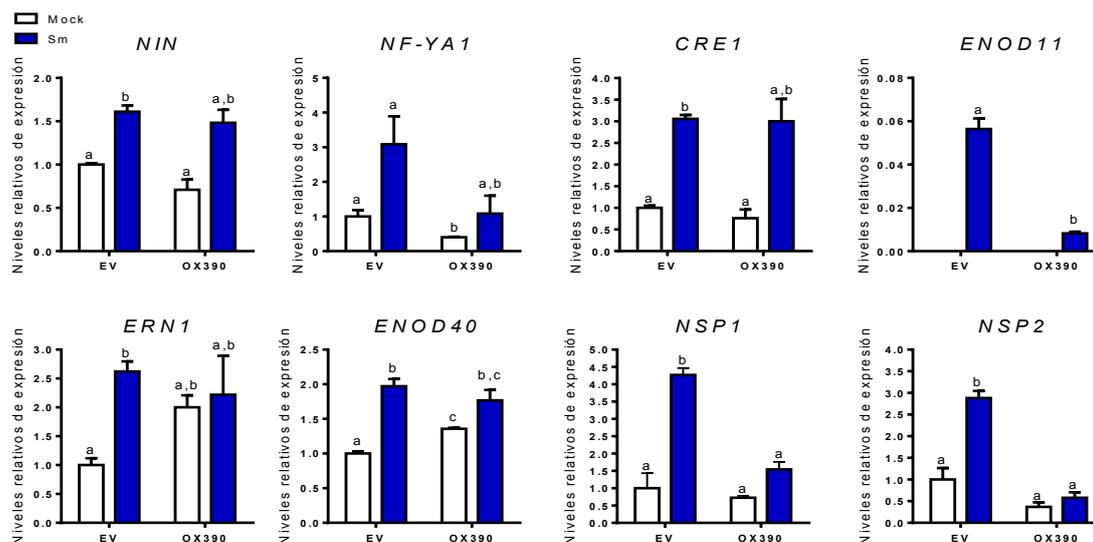


Figura 31. La sobreexpresión del pre-miR390b afecta la inducción de los transcritos *ENOD11*, *NSP1* y *NSP2* en respuesta al rizobio. Los niveles de acumulación de *NIN*, *ENOD11*, *NF-YA1*, *CRE1*, *ERN1*, *ENOD40*, *NSP1* y *NSP2* fueron cuantificados en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390) inoculadas con agua (mock) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de dos replicas biológicas independientes. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcritos *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV mock. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*).

No existen evidencias que sustentan que los genes analizados sean regulados post-transcripcionalmente por miR390 o tasiARFs. Es posible que los transcritos cuyos niveles de expresión se encuentran afectados por la sobreexpresión de miR390 sean *targets* de los factores de transcripción *ARF2*, *ARF3* y/o *ARF4* o bien que se encuentren regulados de manera indirecta por la vía de miR390/*TAS3*.

Posteriormente, se verificaron los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* en respuesta del rizobio en las raíces EV y OX390. Los niveles de expresión de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* se encontraron incrementados en respuesta al rizobio en las raíces control. Sin embargo, en las raíces OX390 no se observó la inducción en la expresión de estos genes frente a la inoculación con *S. meliloti* (Figura 32). Por lo cual, tanto los niveles de expresión de *ENOD11*, *NSP1* y *NSP2* como los de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* se encuentran alterados en las raíces OX390 en respuesta al rizobio.

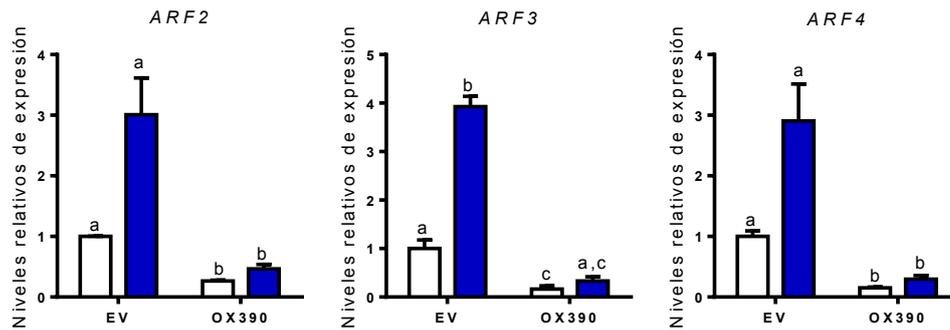


Figura 32. La activación de la vía miR390/TAS3 inhibe la inducción de los transcritos de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* en respuesta al rizobio. Los niveles de acumulación de *ARF2*, *ARF3*, y *ARF4* fueron cuantificados en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de dos replicas biológicas independientes. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV *mock*. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*).

Para corroborar si existe una correlación entre los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* y los niveles de *ENOD11*, *NSP1* y *NSP2* en respuesta al rizobio se procedió a analizar los niveles de acumulación de los genes marcadores de nodulación y *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* en las raíces que expresan el *target mimicry* dirigido contra miR390 (MIM390). Se observó que los niveles de los transcritos *ARF2* y *ARF4* se mantienen incrementados tanto en ausencia como en presencia del rizobio en las raíces MIM390 respecto a las raíces EV (Figura 33 A). En ausencia de rizobio (*mock*) las raíces MIM390 exhibieron mayores niveles de expresión de los genes *NIN*, *CRE1*, *ERN1*, *ENOD40*, *NSP1* y *NSP2* respecto a las raíces control. Sin embargo, frente a la inoculación con el rizobio no se observaron cambios significativos en los niveles de *NIN*, *CRE1*, *ENOD11*, *ERN1* y *ENOD40* entre las raíces MIM390 y las EV. En contraposición, se observó una inducción en respuesta al rizobio de los transcritos *NSP1* y *NSP2* en las raíces MIM390, incluso la inducción de ambos genes fue mayor comparada con la inducción en las raíces control (Figura 33 B).

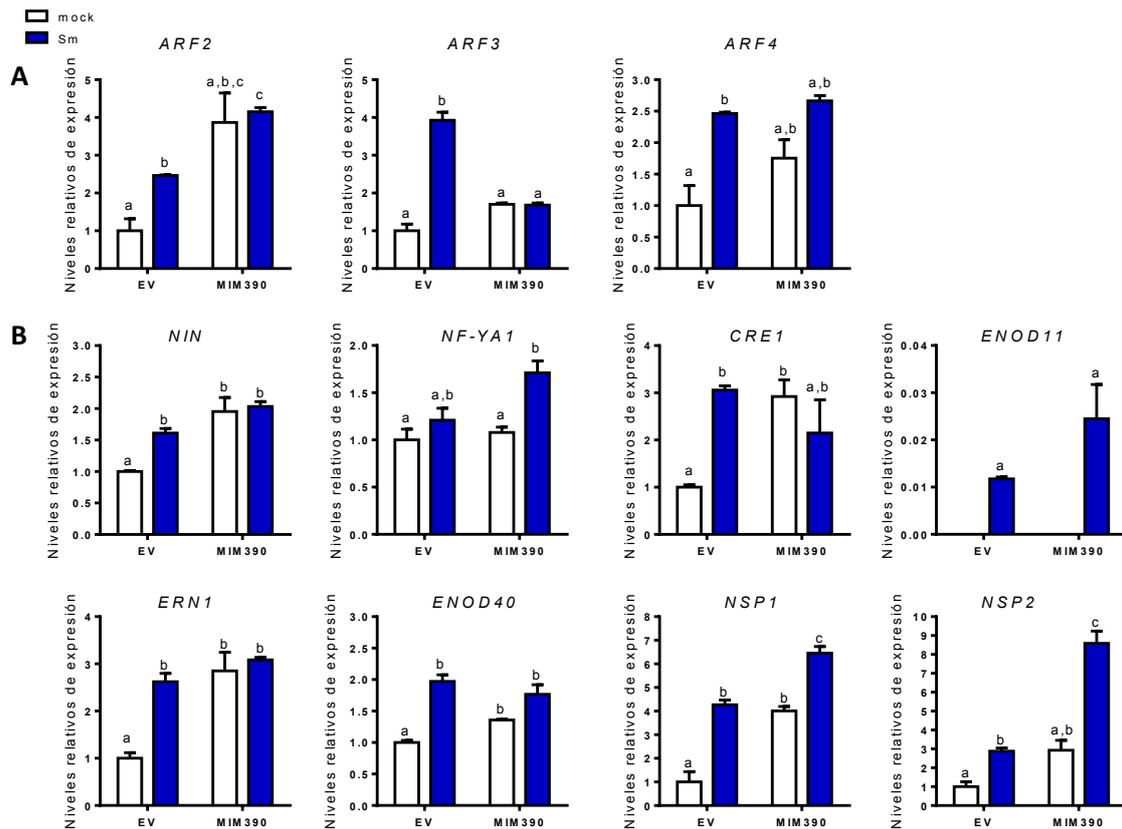


Figura 33. La inducción de los transcritos *NSP1* y *NSP2* se encuentra incrementada en las raíces MIM390 en respuesta al rizobio. **A.** Los niveles de acumulación de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* y de **B.** *NIN*, *ENOD11*, *NF-YA1*, *CRE1*, *ERN1*, *ENOD40*, *NSP1* y *NSP2* fueron cuantificados en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o en las raíces que sobreexpresan un *target mimicry* contra miR390 (MIM390) inoculadas con agua (mock) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de dos replicas biológicas independientes. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcrita *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV mock. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*).

Los resultados presentados en la Figura 33 demuestran que las raíces que expresan el *target mimicry* de miR390, las cuales exhiben niveles incrementados de los transcritos *ARF2* y *ARF4*, poseen también alterados los niveles de expresión de los genes *NIN*, *CRE1*, *ERN1*, *ENOD40*, *NSP1* y *NSP2* en ausencia del rizobio. Para investigar si alguno de los genes marcadores de nodulación podría ser *target* directo de los factores de transcripción *ARF2*, *ARF3* o *ARF4* se realizó un análisis de los elementos regulatorios presentes en sus promotores. Este análisis permitió detectar entre dos a cinco elementos de unión a auxinas (ARE) putativos en los promotores de estos genes, excepto en el gen *ENOD11* el cual no posee sitios AREs en su secuencia promotora (Tabla 3).

Tabla 3. Elementos de respuesta a auxinas (ARE) presentes en los promotores* de los marcadores de nodulación.

Gen	Ubicación** y orientación*** de AREs
<i>NIN</i>	61 -, 667 +, 677 +, 764 - y 1.714 -
<i>ENOD11</i>	-
<i>NF-YA1</i>	207 +, 829 -, 1.056 - y 1.517 +
<i>CRE1</i>	421 + y 971 -
<i>ERN1</i>	252 +, 1.962 + y 1.969 -
<i>ENOD40</i>	705 + y 1145 +
<i>NSP1</i>	199 +, 307 -, 1.664 - y 1.900 -
<i>NSP2</i>	180 +, 240 -, 1.443 + y 1.468 +

Tabla 3. Los sitios ARE se identificaron con el software PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>). Se verificó manualmente que los 2.000 nts seleccionados como promotor no se solapan con genes vecinos y, para los casos en que esto ocurría se redujo la zona del promotor. *Fragmento de 2.000 nts aguas arriba del codón de inicio de la traducción. **La ubicación de los sitios AREs está referida al número de nts cuantificados desde el sitio ARE al codón de inicio de la traducción. ***Orientación de los sitios AREs en la hebra directa (+) o complementaria (-) del DNA.

Por lo tanto, los genes *NIN*, *NF-YA1*, *CRE1*, *ERN1*, *ENOD40*, *NSP1* y *NSP2* podrían ser *targets* putativos de los factores de transcripción pertenecientes a la familia ARF. Sin embargo, se requiere evidencias experimentales adicionales para determinar si estos genes pueden ser regulados a nivel transcripcional por ARF2, ARF3 y/o ARF4. Cabe destacar que en las raíces OX390 no se observó una alteración significativa en los niveles de expresión de *NIN*, *NF-YA1* y *CRE1*, lo cual sugiere que estos genes no serían *targets* directos de ARF2, ARF3 y/o ARF4. Al aumentar los niveles de ARF2, ARF3 y ARF4 se puede estar produciendo una unión forzada de los ARFs a los sitios ARE o bien una heterodimerización forzada con otros ARFs. Cabe destacar que *NIN* es regulado por el complejo NSP1/2 y a su vez *NIN* regula a *NF-YA1*, por lo tanto el aumento de *NIN* y *NF-YA1* podría ser un efecto indirecto de la mayor acumulación de *NSP1* y *NSP2*. Sin embargo, el patrón de expresión de *NSP1* y *NSP2* en las raíces OX390 y MIM390 sugiere que ambos factores de transcripción serían los candidatos por medio de los cuales la vía de miR390/TAS3 y la vía de señalización de la nodulación se intersectan.

Consistentemente con MIM390, las raíces de las mutantes en el gen *AGO7* acumularon mayores niveles de los transcriptos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, tanto en presencia como en ausencia de rizobio (Figura 34 A). Además, la inducción de los factores de transcripción *NSP1* y *NSP2* en respuesta a *S. meliloti* fue mayor comparada con la inducción en las raíces WT (Figura 34 B).

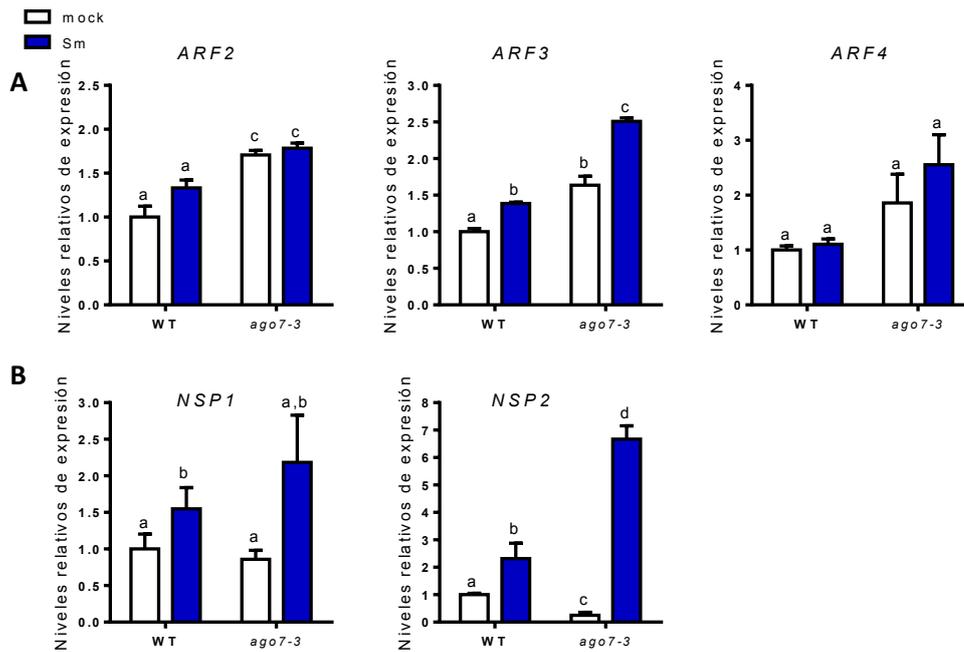


Figura 34. La inducción de los transcritos *NSP1* y *NSP2* se encuentra incrementada en las raíces *ago7* en respuesta al rizobio. **A.** Los niveles de acumulación de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* y de **B.** *NSP1* y *NSP2* fueron cuantificados en las raíces WT y en las raíces mutantes *ago7-3* inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (*Sm*) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de dos replicas biológicas independientes. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcritos *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control WT *mock*. Las letras indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*).

3.2. La represión de miR390 en etapas tempranas de la interacción simbiótica es independiente de los NFs

Como se mencionó en la introducción, la percepción de los NFs por los receptores ubicados en las células epidérmicas en la raíz de las leguminosas es suficiente para desencadenar la reprogramación transcripcional necesaria para la iniciación y desarrollo de la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo. Para determinar si la disminución de los niveles de miR390 a las 48 hpi con *S. meliloti* depende de la percepción de NFs se crecieron plantas WT en medio Fahraeus. A los 7 días post germinación un grupo de estas plantas se inoculó con una suspensión de 10^{-8} M de NFs, otro con *S. meliloti* y un tercero con agua (*mock*) como control. Las raíces tratadas con NFs se colectaron a las 24 hpi debido a que la respuesta de las plantas tratadas con NFs purificados es más rápida que las plantas inoculadas con el rizobio. Las raíces inoculadas con el rizobio se colectaron a las 48 hpi. Se realizó la extracción total de RNA seguido de la cuantificaron los niveles de miR390 y tasiARFs, *ENOD11* y *ERN1*. Como era esperable, los niveles de miR390 y tasiARFs se redujeron en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*; sin embargo, no se vieron afectados por el tratamiento con los NFs

purificados (Figura 35 A). Este resultado indicaría que la represión de miR390 a las 48 hpi con *S. meliloti* es independiente de los NFs. La inducción de los niveles de expresión de los transcriptos *ENOD11* y *ERN1* confirmaron la respuesta de las raíces tanto a la inoculación con el rizobio como con los NFs (Figura 35 B). Por otra parte, se analizó si la disminución de los niveles de miR390 en las raíces WT a las 48 hpi con *S. meliloti* se encuentra afectada en los mutantes *nsp1*, *nsp2* (Kaló et al., 2005; Smit, 2005), *nf-ya1* (Laporte et al., 2014) y *nfp* (Catoira et al., 2001). Las raíces *nsp1*, *nsp2*, *nf-ya1* y *nfp* respondieron de manera similar a las raíces WT en respuesta al rizobio (Figura 35 C), por lo cual la represión de miR390 sería independiente de los factores de transcripción NSP1, NSP2 y NF-YA1 y del receptor NFP.

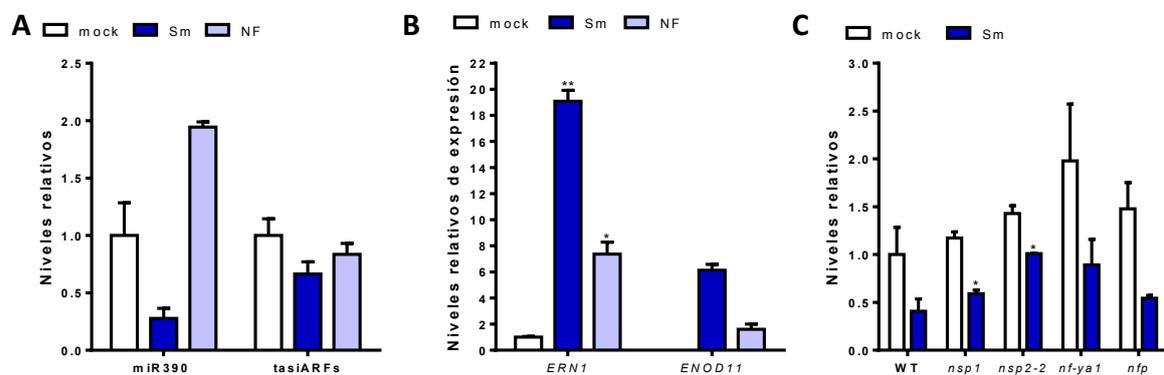


Figura 35. Análisis de la dependencia de la represión de miR390 con la vía de señalización activada por NFs Niveles de acumulación de **A.** miR390 maduro y tasiARFs **B.** *ERN1* y *ENOD11* cuantificados mediante la técnica de *stem-loop* RT-qPCR o RT-qPCR, respectivamente en raíces de *M. truncatula* inoculadas con agua (*mock*), con 10^{-8} M de NFs (NF) o con *S. meliloti* 1021 (Sm). **C.** Niveles de acumulación del miR390 maduro cuantificados mediante la técnica de *stem-loop* RT-qPCR en raíces de *M. truncatula* WT y mutantes en el gen *NSP1* (*nsp1*), *NSP2* (*nsp2-2*), *NF-YA* (*nf-ya1*) y *NFP* (*nfp*) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a 48 horas post-inoculación. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de 3 réplicas técnicas. Los niveles de miR390 y tasiARFs fueron normalizados por los niveles del pequeño RNA *U6* y los niveles de *ERN1* y *ENOD11* por el transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control *mock*. Los asteriscos indican que los valores de las muestras Sm son significativamente diferentes de las muestras WT *mock* en un test *t*-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,05$ (**).

DISCUSIÓN

4. Discusión Capítulo I

En este capítulo se muestra que la vía miR390/*TAS3* está involucrada en la regulación del desarrollo de órganos laterales post-embriónicos en las raíces de *M. truncatula*. Por un lado, esta vía actúa modulando positivamente el crecimiento de las raíces laterales, mientras que en la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti* actúa como un módulo de regulación negativo.

4.1. El rol de la vía miR390/TAS3 sobre el desarrollo de las raíces laterales

La iniciación de la formación de la RL requiere de una concentración transitoria de auxinas en la zona meristemática basal de la RP (De Smet et al., 2007). En *A. thaliana* la vía miR390/TAS3 actúa como un módulo regulador en respuesta a auxinas que controla el crecimiento de las RLs. La sobreexpresión de *AtTAS3a*, ya sea bajo el promotor 35S o por medio de una línea mutante activada en *AtTAS3a*, promueve el crecimiento de las RLs emergidas (Marin et al., 2010). En este capítulo, hemos demostrado que la sobreexpresión de miR390 aumenta la sensibilidad a auxinas y promueve el crecimiento de las RLs en *M. truncatula*, probablemente mediante un incremento en la respuesta y/o señalización a auxinas. Recientemente, He y colaboradores (2018) han reportado que la sobreexpresión de miR390 en álamo (*Populus spp.*) promueve el crecimiento de las RLs, lo cual sugiere que la función de la vía miR390/TAS3 sobre el desarrollo de las RLs estaría conservada en estas especies.

En *M. truncatula* los genes *MIR390a* y *MIR390b* se expresan en la vasculatura de las RLs y las RPs. Estos resultados son consistentes con los descritos previamente en *Arabidopsis* y en álamo (Marin et al., 2010; He et al., 2018). A su vez, *ARF3* y *ARF4a*, *targets* de la vía miR390/TAS3, también se expresan en el tejido vascular de las raíces. En los primordios de las RLs se observó un solapamiento en la actividad de los promotores de *MIR390a*, *ARF3* y *ARF4a*. Estos resultados son similares a los observados en *Arabidopsis* durante el desarrollo de las RLs (Marin et al., 2010) y sugieren que la vía miR390/TAS3 posee una función conservada entre *Arabidopsis* y *M. truncatula* en el desarrollo de las RLs. Una vez que emerge la RL, la expresión de *MIR390a*, *ARF3* y *ARF4a* se restringe a la zona meristemática. El meristema es el encargado de controlar el crecimiento de la raíz promoviendo la proliferación y posterior elongación celular. Lo cual sugiere que miR390 es necesario para la regulación de la proliferación y/o diferenciación de las células mediante el incremento de la sensibilidad y/o respuesta a auxinas en las RLs. Estos resultados plantean una perspectiva interesante para la manipulación del crecimiento de las RLs en la agricultura, por ejemplo, al aumentar los niveles endógenos de miR390 en las raíces de plantas de interés agronómico se favorecería el crecimiento de las RLs, lo cual implica una mayor superficie para la incorporación de agua y nutrientes y/o la interacción con simbiontes (micorrizas/rizobios) o bacterias promotoras del crecimiento.

4.2. El rol de la vía miR390/TAS3 durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno

A las 48 horas post-inoculación de las raíces de *M. truncatula* con *S. meliloti* se desencadenan las respuestas moleculares necesarias para la infección rizobiana en la epidermis de la raíz y, paralelamente, en los tejidos del córtex interno, periciclo y endodermos, comienza la dediferenciación de las células que darán origen al primordio del nódulo (Reynoso et al., 2013; Xiao et al., 2014). En este estadio, la vía de miR390/TAS3 se encuentra reprimida, liberando a los factores de transcripción *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* de la represión post-transcripcional mediada por los tasiARFs. La disminución de los niveles de miR390 es independiente de la cascada de señalización desencadenada por la percepción de los NFs. A su vez, en etapas tempranas de la interacción (6 dpi) se detectó expresión del locus *MIR390b* asociado a los ITs, en las células epidérmicas adyacentes a la ramificación del IT y en las células corticales en división, sin embargo no se observó expresión de *MIR390a* en esta etapa, lo cual indica que los promotores de *MIR390a* y *MIR390b* están regulados de manera independiente y responden a diferentes procesos de desarrollo en las raíces de *M. truncatula*: *MIR390a* está relacionado con la elongación de las RLs, mientras que *MIR390b* se activa específicamente en etapas tempranas de la infección rizobiana. En *Arabidopsis*, la transcripción del gen *MIR390* es activada en respuesta a auxinas (Yoon et al., 2010). Los rizobios son capaces de sintetizar auxinas, por lo cual el análisis de la expresión de *MIR390b* utilizando cepas de *S. meliloti* mutantes en la producción de auxinas permitiría investigar si la expresión de *MIR390b* se activa alrededor de los ITs a causa de las auxinas provenientes del rizobio. Llamativamente, no se observó activación del promotor del *target* de miR390, *TAS3*, en esta etapa de la interacción. No se puede descartar la presencia del transcripto *TAS3*, ya que mediante el análisis de los promotores se está observando la activación de la expresión del gen y no los niveles estacionarios del transcripto. Sin embargo, miR390 también podría estar asociado a una función en la infección bacteriana a través de la regulación de otros *targets*. En nódulos inmaduros (10 dpi), la expresión de *MIR390b* y *TAS3* coinciden en las células que están siendo alcanzadas por los ITs en la zona de infección del nódulo. La expresión de ambos genes cesa una vez que las células se encuentran completamente ocupadas por el rizobio. Las auxinas son una de las principales hormonas en la regulación de la infección rizobiana y el desarrollo de los nódulos. Recientemente, se ha reportado que los inhibidores del influjo de auxinas 1-NOA (ácido 1-naftoxiacético) y 2-NOA, así como también la mutación del gen que codifica para el transportador de auxinas *LAX2*, reducen la nodulación en *M. truncatula* (Roy et al., 2017). Por lo tanto, es necesario un influjo localizado de auxinas en el sitio de infección del rizobio para la

formación del nódulo. Por otro lado, se ha demostrado que la formación de nódulos se incrementa en raíces que poseen reducida la sensibilidad a auxinas (Kuppusamy et al., 2009). En este trabajo, hemos demostrado que las raíces de *M. truncatula* que sobreexpresan el pre-miR390b exhiben una menor frecuencia de eventos de infección y también una reducción en la formación de nódulos, lo cual se correlaciona con el incremento de la sensibilidad a auxinas en dichas raíces. La sobreexpresión del pre-miR390b conlleva una reducción de los niveles de los transcriptos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. Breakspear y colaboradores (2014) han mostrado que la mutación de un gen perteneciente a la familia ARF, *ARF16*, incrementa la sensibilidad a auxinas y disminuye los eventos de infección rizobiana en las raíces de *M. truncatula* (Breakspear et al., 2014), lo cual se correlaciona con los resultados observados en este trabajo de tesis. En el trabajo de Breakspear y colaboradores (2014), los autores analizan los cambios transcripcionales que se desencadenan en los pelos radicales frente al tratamiento con el rizobio y reportan la activación transcripcional de los genes de respuesta a auxinas *GH3*, *SAUR1* y *ARF16* en los sitios de infección. En nuestros resultados hemos encontrado que *ARF4* se expresa en estadios tempranos de la infección bacteriana (2-6 dpi), lo cual sugiere, junto con los resultados de Breakspear et al. (2014), la importancia de la señalización y/o respuesta a auxinas en el proceso de infección rizobiana. Consistentemente, las raíces que expresan el *target mimicry* de miR390 y las plantas mutantes en *AGO7* (las cuales poseen niveles aumentados de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*) exhiben un mayor número de eventos de infección. Adicionalmente, hemos mostrado que la alteración de la vía de miR390/*TAS3* (ya sea mediante la activación o la inhibición) afecta el número de nódulos. Es posible que este efecto sobre la nodulación sea consecuencia de la alteración de los eventos de infección. Cabe destacar que no sólo el número de nódulos se encuentra reducido en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b sino también el número de células infectadas en la zona de infección del nódulo maduro. Por otro lado, los genes que componen la vía de miR390/*TAS3* se expresan en las células donde están llegando los ITs y en las células que carecen de simbiosomas, por lo cual la vía también tendría una función en liberación de la bacteria dentro de los simbiosomas durante el desarrollo del nódulo (10-21 dpi).

En los nódulos de tipo indeterminado, se ha reportado que la señalización de auxinas se restringe en la zona meristemática del nódulo maduro (Mathesius et al., 1998; Suzaki et al., 2013). Los niveles de expresión de los genes de respuesta a auxinas *GH3*, *SAUR1* y *ARF16* se encuentran enriquecidos en la zona apical del nódulo, particularmente en el meristema y en la zona de infección (Breakspear et al., 2014). Consistentemente, la expresión de *MIR390* y *ARF4* se encontró activa en la zona meristemática, y en la zona de infección. En *A. thaliana*, se ha reportado que *ARF2* y *ARF3* actúan como reguladores positivos y *ARF4* como un regulador

negativo sobre la expresión de miR390 (Marin et al., 2010) durante la formación de las RLs. En *M. truncatula* no se ha demostrado la existencia de dicha regulación, pero se podría sugerir que la expresión de *ARF4* en la zona de infección de nódulo podría estar restringiendo la expresión de los otros genes componentes de la vía a la región meristemática. Si bien hemos demostrado que la vía miR390/*TAS3* desempeña un papel fundamental durante el inicio de la infección bacteriana, la vía también juega un rol importante durante estadios avanzados de la interacción simbiótica. El análisis fenotípico de las raíces que expresan el *target mimicry* del miR390 y las plantas mutantes en la proteína AGO7 muestra que la vía es requerida para el control del número y la distribución de los nódulos, así como también para mantener un único meristema por nódulo.

4.3. Vinculación entre las vías de miR390/*TAS3* y de nodulación

Con el fin de establecer una conexión entre miR390 y la vía de señalización molecular requerida para la nodulación, hemos identificado una correlación entre el módulo miR390/*TAS3* y dos factores de transcripción de la familia GRAS, *NSP1* y *NSP2*, esenciales para la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005). La activación de la vía miR390/*TAS3* (OX390) previene la inducción de *NSP1* y *NSP2* en respuesta al rizobio. Consistentemente, la inactivación de dicha vía (MIM390 y *ago7*) incrementa los niveles de *NSP1* y *NSP2* en las raíces de *M. truncatula* frente a la inoculación con *S. meliloti*. Los niveles alterados de *NSP1/2* y *ARF2/3/4* podrían explicar los fenotipos observados en las raíces OX390, MIM390 y *ago7*. Los niveles de acumulación de los transcritos *NIN*, *NF-YA1* y *CRE1* también se vieron aumentados en las raíces MIM390, sin embargo no se observó una alteración significativa de estos transcritos en las raíces OX390, lo cual sugiere que estos genes no serían *targets* directos de la vía miR390/*TAS3*. Los promotores de *NIN*, *NF-YA1* y *CRE1* poseen los sitios de unión (ARE) de la familia de los factores de transcripción ARF. Al aumentar los niveles de ARF2, ARF3 y ARF4 se puede estar produciendo una unión forzada de los ARFs a los sitios ARE o bien una heterodimerización forzada con otros ARFs. Cabe destacar que *NIN* es regulado por el complejo NSP1/2 y a su vez *NIN* regula a *NF-YA1* (Figura 36), por lo tanto el aumento de *NIN* y *NF-YA1* podría ser un efecto indirecto de la mayor acumulación de *NSP1* y *NSP2*. Por otro lado, los niveles de *ENOD11* en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b se encontraron alterados frente a la inoculación con *S. meliloti*. Es probable que la menor acumulación de este transcrito en respuesta al rizobio sea una consecuencia de la inhibición de la inducción de *NSP1* y *NSP2* ya que *ENOD11* es regulado por el complejo NSP1/NSP2 (Figura 36). La sobreexpresión de miR171h, el cual reduce los niveles de expresión de *NSP2*,

también resulta en una reducción del número de nódulos en *M. truncatula* (Hofferek et al., 2014). Los resultados de este capítulo y los descriptos por otros grupos nos permitió proponer el modelo detallado en la Figura 36, en el cual la vía miR390/TAS3 intersecta la vía de señalización de la nodulación a través de *NSP1* y *NSP2*. El mecanismo por el cual el módulo miR390/TAS3 regula los niveles de *NSP1/2* no ha sido aún esclarecido. Una posibilidad es que *NSP1* y *NSP2* sean *targets* directos de ARF2, ARF3 y/o ARF4. El análisis de los promotores determino que ambos genes poseen cuatros sitios ARE sin embargo se requieren evidencias experimentales para corroborar esta posibilidad. *NSP1* y *NSP2* forman un heterodímero y se unen a los promotores de *NIN*, *ERN1* y *ENOD11* (Hirsch et al., 2009). En las raíces OX390 se pierde la inducción de *NSP1/2* en respuesta al rizobio, no obstante la inducción de *NIN* y *ERN1* ocurre normalmente. Una posible explicación es que *NIN* y *ERN1* también son activados transcripcionalmente por *IPD3* (Singh et al., 2014; Cerri et al., 2017). A su vez *ERN1*, regula a *ENOD11* y es activado por el complejo heterotrimérico NF-Y (Middleton et al., 2007; Hirsch et al., 2009; Vernié et al., 2015) (Figura 36). Es decir que la inducción parcial de *ERN1* y *ENOD11* observada en las raíces OX390 podría estar dada por la cascada de factores de transcripción IPD3/NIN/NF-YA, en forma independiente de la inducción de *NSP1* y *NSP2*.

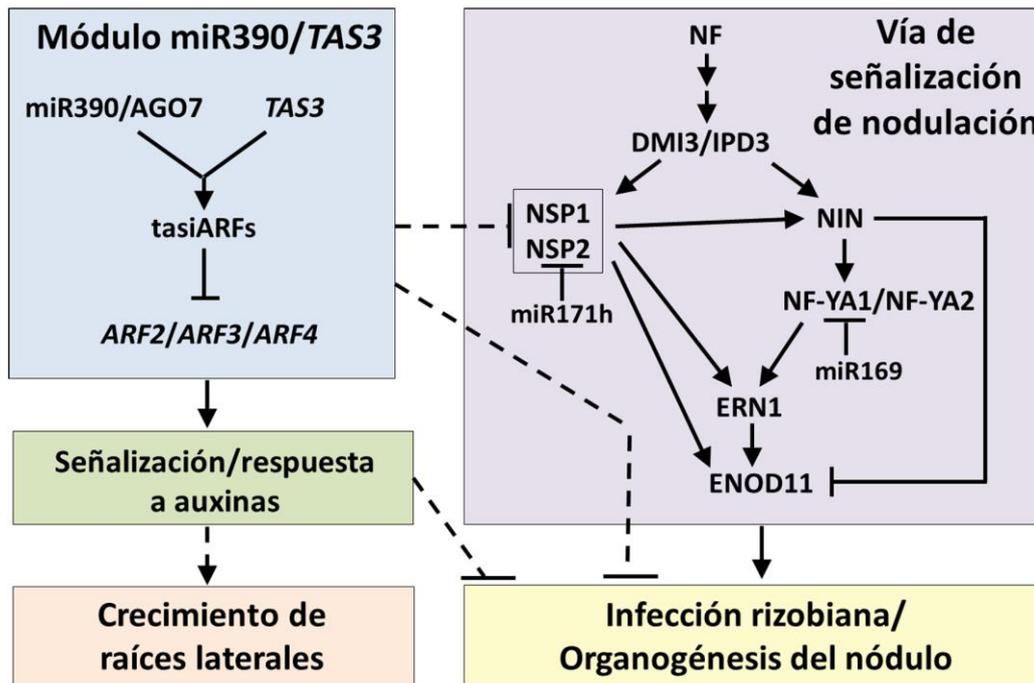


Figura 36. Modelo esquemático de la intersección entre las vías de miR390/TAS3 y de señalización de la nodulación en *M. truncatula*. El módulo miR390/TAS3, mediante la producción de tasiARFs, regula negativamente los niveles de acumulación de los factores de transcripción ARF2/3/4. Este módulo aumenta la señalización y/o respuesta a auxinas (Marin et al., 2010, este trabajo) promoviendo el crecimiento de las raíces laterales. El incremento de la señalización de auxinas afecta negativamente la infección rizobiana y la nodulación (Breakspear et al., 2014 y este trabajo). A su vez, el módulo miR390/TAS3 regula negativamente, por mecanismos aún desconocidos, la expresión de *NSP1/NSP2*, dos genes requeridos para la nodulación (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005). La activación de la vía miR390/TAS3 afecta negativamente la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo mediante *NSP1* y *NSP2* y/o por un mecanismo independiente. La vía de señalización de la nodulación involucra la percepción de *Nod Factor* (NF) y la activación de *DMI3* (Levy et al., 2004). *DMI3* interactúa y activa a *IPD3* (Singh et al., 2014) iniciando una cascada jerárquica de factores de transcripción incluyendo a *NIN*, *NF-YA1/NF-YA2* por un lado y a *NSP1/NSP2* por el otro. *ERN1* es regulado por el complejo *NSP1/NSP2* así como también por el complejo *NF-Y* (Marsh et al., 2007; Laloum et al., 2014; Hirsch et al., 2009). *NIN* y *ERN1* son regulados por *IPD3* (Singh et al., 2014, Cerri et al., 2017). A su vez, *ERN1* y *NSP1/NSP2* activan la expresión de *ENOD11* (Middleton et al 2007, Hirsch et al 2009). *NIN* regula negativamente a *ENOD11* en la epidermis (Vernie et al., 2015). *NF-YA1* es *target* de miR169 y *NSP2* es *target* de miR171h (Combiere et al., 2006. Hofferek et al., 2014.)

Estos resultados demuestran que la vía miR390/TAS3, la cual controla la estabilidad de transcriptos involucrados en la señalización y respuesta a auxinas (*ARF2/3/4*), regula negativamente la infección rizobiana y la formación de nódulos en las raíces de *M. truncatula*. En las plantas mutantes en el gen *AGO7*, las cuales poseen niveles de los mRNAs *ARF2/3/4* aumentados, la infección rizobiana y la nodulación se encuentran incrementadas. En *Phaseolus vulgaris*, una especie que forma nódulos de tipo determinados, hemos observado que la sobreexpresión de miR390 tiene efectos negativos sobre la formación de nódulos y la infección por rizobios (Mélisse Castaingts, Tesis Doctoral 2018, UNLP). Sin embargo, en la leguminosa *L. japonicus* que también desarrolla nódulos determinados se ha reportado un efecto contrario (Li et al., 2014). Las mutantes *rel3/ago7*, las cuales producen menores niveles de tasiARFs y acumulan mayores niveles de *ARF3a/b* y *ARF4*, desarrollan un menor número de nódulos e ITs

(Li et al., 2014). Estos fenotipos de nodulación contrarios entre *M. truncatula ago7* y *L. japonicus rel3/ago7* sugiere que la inactivación de la vía miR390/TAS3 tendría efectos diferentes sobre la nodulación dependiendo de la especie de leguminosa. El módulo miR390/TAS3 interviene en el desarrollo de la parte aérea de la planta. Se ha reportado que la regulación negativa de los niveles de tasiARFs impacta de diferentes maneras en el fenotipo de parte aérea en distintas especies. Por ejemplo las mutantes *L. japonicus rel3/ago7* exhiben menor número de foliolos y una alteración en la polaridad abaxial-adaxial (Yan et al., 2010), mientras que en las mutantes de *M. truncatula ago7* los márgenes de las hojas se encuentran alterados así como también la separación de los órganos aéreos laterales (Zhou et al., 2013). Por otra parte, en *O. sativa* el efecto es más extremo ya que el bloqueo en la producción de tasiARFs resulta en la pérdida total o formación anormal del SAM (Liu et al., 2007; Nagasaki et al., 2007). A partir de estas comparaciones es posible concluir que cada especie exhibe diferentes fenotipos cuando se bloquea la producción de tasiARFs, tanto en parte aérea como en la formación de nódulos en el caso de leguminosas. Esta conclusión plantea que, si bien la vía miR390/TAS3 se encuentra altamente conservada en angiospermas, esta vía podría controlar el desarrollo de órganos laterales por diferentes mecanismos dependiendo de la especie. La identificación de los genes que *targets* directos de los factores ARF2, ARF3 y ARF4 en las diferentes especies resulta crucial para definir dichos mecanismos. En este sentido, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de secuenciación (ChIP-seq) para cada ARF permitirá una comparación sistemática y contribuirá a encontrar similitudes y diferencias en los mecanismos regulatorios controlados por la vía miR390/TAS3 en las diferentes especies.

CAPÍTULO II

Variantes alternativas del transcripto *TAS3* y sus funciones durante el desarrollo de raíces laterales y nódulos en *M. truncatula*

RESULTADOS

1. Variantes del transcripto *TAS3* y su asociación a polirribosomas en etapas tempranas de la interacción simbiótica

La técnica denominada TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*) permite aislar la población de RNAs asociados a uno a más ribosomas, conocida con el nombre de “traductoma”. Esta técnica se basa en la expresión de una proteína ribosomal, en particular RPL18 (*Ribosomal Protein Large Subunit 18*), fusionada a un epítopo FLAG, la cual es incorporada en ribosomas y polirribosomas (polisomas). El epítopo FLAG provee una manera de aislar los ribosomas y polisomas que contienen la proteína FLAG-RPL18 mediante inmunopurificación utilizando anticuerpos dirigidos contra el epítopo FLAG conjugados a agarosa y/o bolillas magnéticas (Zanetti et al., 2005). Previamente, en nuestro laboratorio, se aplicó la técnica de TRAP a raíces de *M. truncatula* para caracterizar a nivel traduccional un conjunto de genes implicados en la respuestas moleculares que controlan la nodulación (Reynoso et al., 2013). Posteriormente, se combinó TRAP con secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) para evaluar a escala global los cambios que ocurrían a nivel de traductoma a tiempos tempranos (48 hpi) de la asociación simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti*. En paralelo, se evaluaron los cambios en el transcriptoma de la raíces inoculadas con *S. meliloti* respecto de aquellas inoculadas con agua como control mediante RNA-seq (Figura 37, Traubenik et al., manuscrito en revisión).

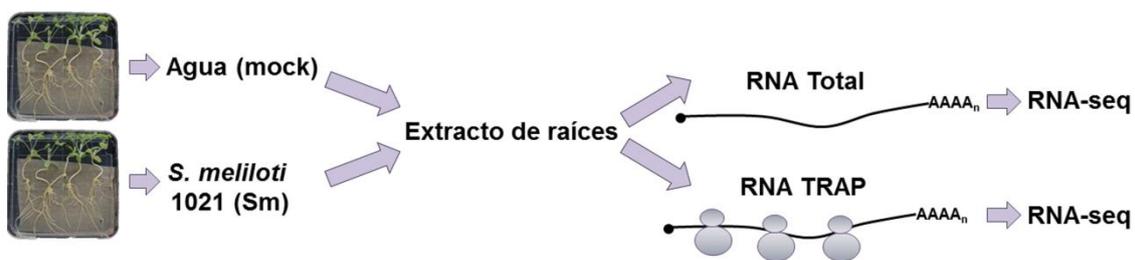


Figura 37. Esquema del diseño experimental utilizado para analizar los cambios traduccionales y transcripcionales en la interacción *M. truncatula*-*S. meliloti*. Las raíces de *M. truncatula* que expresan la proteína FLAG-RPL18 fueron inoculadas con agua (*mock*) como control o con *S. meliloti* 1021 (Sm). A las 48 horas post-inoculación (hpi) se colectaron las raíces y se preparó un extracto en un *buffer* que mantiene la integridad de los polisomas. Una alícuota del extracto total se reservó para la extracción de RNA total y el resto fue sometido a la purificación de polisomas mediante TRAP. Se extrajo el RNA a partir de cada muestra (RNA total y RNA TRAP), el cual se utilizó en la construcción de bibliotecas de DNA complementario (cDNA). Las bibliotecas fueron posteriormente secuenciadas mediante la tecnología Illumina (RNA-seq).

El análisis de las lecturas correspondientes al transcripto *TAS3* a partir de los datos generados mediante TRAP-seq permitió detectar dos posibles formas alternativas para este

transcripto. La isoforma *TAS3*, previamente descrita, a partir de la cual se generan los tasiARFs, y una nueva isoforma, a la cual denominamos *AL TAS3* (por, *ALternative TAS3*). *AL TAS3* presenta mayores niveles en las muestras de RNA TRAP provenientes de las raíces inoculadas con *S. meliloti* respecto de aquellas inoculadas con agua (*mock*). Ambas isoformas poseen un pequeño marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) de 201 nts cuyo codón de terminación se ubica 8 nts aguas arriba del sitio de unión 5' no-clivable de miR390. Sin embargo, el transcripto *AL TAS3* es 316 nts más corto que *TAS3* hacia el 3', por lo que carece del sitio de unión 3' clivable de miR390, pero contiene el sitio de unión 5' no-clivable de miR390 (Figura 38 A). Esta nueva isoforma de *TAS3* no fue descrita previamente en plantas, no obstante una exhaustiva búsqueda bibliográfica nos permitió hallar un estudio global de sitios putativos de poliadenilación alternativa (APA, *alternative polyadenylation*) en *A. thaliana* (Hunt, 2012). El autor propone que el *locus* de *AtTAS3a* puede generar dos isoformas del transcripto mediante APA, de los cuales solamente uno está sujeto al clivaje por miR390. Para verificar la generación de la nueva isoforma *AL TAS3* en *M. truncatula* se realizó un ensayo 3' RACE (*3' rapid amplification of cDNA ends*). El 3' RACE nos permitió identificar las dos isoformas, *TAS3* y *AL TAS3*, y verificar que *AL TAS3* se acumula específicamente en respuesta al rizobio (Figura 38 B). La secuencia de *AL TAS3* se confirmó mediante secuenciación pudiendo identificarse varias A (adeninas) en el extremo 3' del fragmento amplificado (Anexo. Secuencias).

Posteriormente se realizó una reacción de RT-PCR semicuantitativa a las 48 hpi para verificar los niveles relativos de acumulación de las dos isoformas alternativas del transcripto *TAS3* en las muestras de RNA Total y RNA TRAP. Para ello, se utilizaron dos juegos de *primers* (Figura 38 A). El primero se une a la región del ORF, por lo que el producto de PCR amplificado proviene de la suma de ambas isoformas de transcritos generados a partir del *locus TAS3*. El segundo juego de *primers* se une a la región en la cual se producen los tasiARFs, por lo cual es específico de la isoforma *TAS3*. Cuando se utilizó el primer juego de *primers* se observó un incremento en los niveles estacionarios de la suma de los transcritos *TAS3* y *AL TAS3* en respuesta al rizobio. Por otro lado, cuando se utilizó el segundo juego de *primers* se observó amplificación de la isoforma *TAS3* en las muestras RNA Total, siendo los niveles estacionarios levemente mayores en las muestras inoculadas con rizobio. Sin embargo, en las muestras RNA TRAP se detectó un producto de amplificación muy tenue correspondiente a la isoforma *TAS3* en las raíces control *mock* y no se observó un producto de amplificación en las raíces inoculadas con *S. meliloti* (Figura 38 C). Estos resultados indican que la isoforma *TAS3*, la cual es necesaria para la producción de tasiARFs, disminuye su asociación a polirribosomas en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*. Por otra parte, este resultado sustenta la

especificidad en la asociación a polisomas de la isoforma *AL TAS3* en las raíces inoculadas con el rizobio.

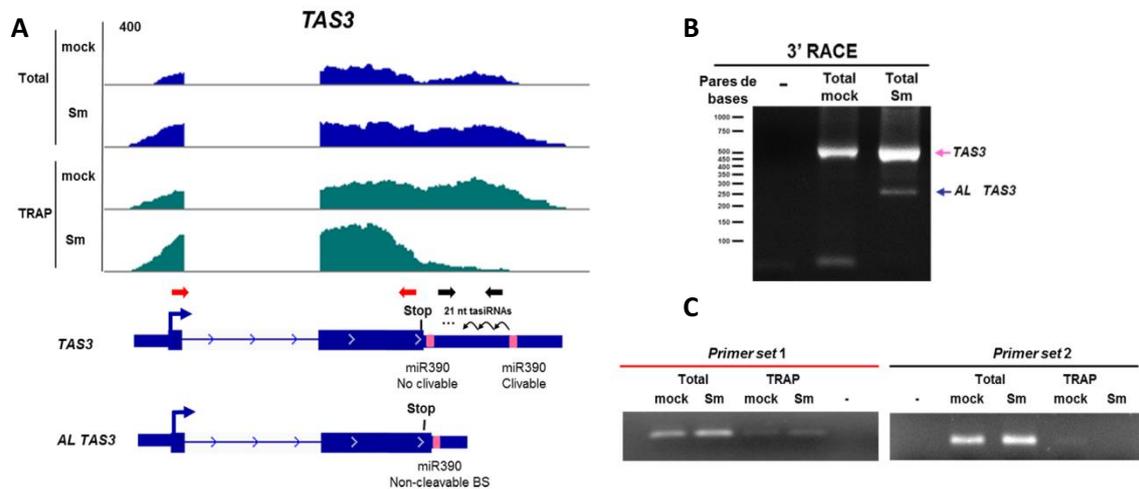


Figura 38. Variantes del transcripto *TAS3* y su asociación a polisomas en respuesta al rizobio. **A.** Imagen obtenida con el *Image Genome Viewer* donde se muestra la cobertura del número de lecturas para el gen *TAS3* y el modelo propuesto para las dos isoformas (*TAS3* y *AL TAS3*) obtenidas del análisis *Tophat/Cufflinks* a partir de los datos de RNA-seq de Reynoso et al., 2013. Los rectángulos rosas corresponden a los sitios de unión de miR390. Se señala el sitio de inicio (flecha azul) y terminación (stop) del ORF, y la región de producción de tasiRNAs, la cual se encuentra contenida entre los dos sitios de unión de miR390. **B.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de la amplificación del 3' RACE para los transcriptos de *TAS3* en las muestras de raíces Total inoculadas con agua como control (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). **C.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de PCR utilizando el juego de *primers* 1 (flechas rojas en **A**) o 2 (flechas negras en **A**) en las muestras de RNA Total y TRAP provenientes de raíces *mock* o Sm a las 48 hpi. Se realizaron 35 ciclos de amplificación.

Previamente demostramos que los niveles de miR390 y tasiARFs disminuyen en las raíces de *M. truncatula* a las 48 hpi con el rizobio (Reynoso et al., 2013 y Capítulo I de esta Tesis). Debido a que la variante *AL TAS3* no conllevaría a la producción de tasiARFs pero retiene el sitio de unión 5' no-clivable de miR390 y sus niveles de expresión aumentan en respuesta a *S. meliloti*, se podría especular que esta isoforma actúa como un *target mimicry* de miR390 endógeno que contribuiría a disminuir la producción de tasiARFs. Consistentemente con esta idea, los estudios del Dr. Reynoso mostraron que si bien los niveles de miR390 disminuyen en las muestras de RNA Total, aumentan aproximadamente 2 veces en las muestras de RNA TRAP inoculadas con el rizobio, lo cual se correlaciona con la disminución en los niveles de tasiARFs en las muestras RNA Total y RNA TRAP inoculadas (Mauricio Reynoso, Tesis Doctoral 2013, UNLP).

Para investigar la función de ambas isoformas alternativas del transcripto *TAS3* y evaluar si la isoforma *AL TAS3* podría actuar como un *target mimicry* de miR390 se generaron construcciones que permiten sobreexpresar ambas isoformas en las raíces de *M. truncatula*. Dichas construcciones se introdujeron en raíces de *M. truncatula* mediante la técnica de transformación con *A. rizogenes* (Chabaud et al., 2006) obteniendo raíces transgénicas que

sobreexpresan las isoformas *TAS3* (OXTAS3) o bien la isoforma *AL TAS3* (OXALTAS3) y raíces transformadas con el vector vacío (EV) como control.

Para verificar la sobreacumulación de cada una de las isoformas de los transcritos producidos a partir del *locus TAS3* se colectaron las raíces, se extrajo el RNA total y se realizó la síntesis de cDNA para cada muestra. Finalmente, se cuantificaron los niveles de acumulación de los transcritos *AL TAS3* y *TAS3* mediante RT-qPCR utilizando los pares de *primers* 1 y 2 indicados en la figura 38 A. Ambos juegos de *primers* se unen al transcripto *TAS3*, por lo cual las raíces OXTAS3 mostraron una acumulación del transcripto *TAS3* en comparación con las raíces control, tanto en las reacciones de amplificación realizadas con el juego de *primers* 1 como en aquellas realizadas con el juego de *primers* 2 (Figura 39 A). Por otra parte, en las raíces OXALTAS3 se observó una mayor acumulación con respecto a las raíces control utilizando el juego de *primers* 1, pero no se observaron diferencias al utilizar los *primers* específicos para la isoforma *TAS3* (juego de *primers* 2, Figura 39 B). Este resultado indica que las raíces OXALTAS3 sobreacumulan específicamente la isoforma *ALT TAS3*.

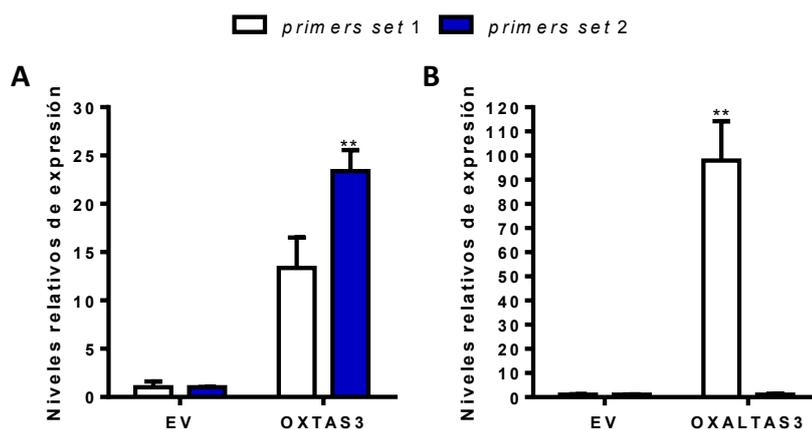


Figura 39. Sobreexpresión ectópica de las isoformas del gen *TAS3* en raíces de *M. truncatula*. A-B. Niveles de acumulación de los transcritos *TAS3* medidos por RT-qPCR utilizando los set de *primers* 1 y 2 (indicados en la figura 39 A) en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o con la construcción para la sobreexpresión de la isoforma *TAS3* (OXTAS3 A) o la sobreexpresión de la isoforma *ALT TAS3* (OXALTAS3 B). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de la media de dos réplicas biológicas independientes. Los niveles de expresión fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV. Los asteriscos indican que los valores de las muestras OXTAS3 o OXALTAS3 son significativamente diferentes de las muestras EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,01$ (**).

2. Las variantes del transcripto *TAS3* afectan el desarrollo de órganos laterales en las raíces de *M. truncatula*

2.1. Las isoformas *TAS3* y *AL TAS3* regulan el crecimiento de las raíces en *M. truncatula*

Con el fin de analizar si la expresión ectópica de las isoformas de *TAS3* afecta el desarrollo de las raíces de *M. truncatula* se evaluó el fenotipo asociado a la arquitectura de la raíz en las plantas compuestas OXTAS3, OXALTAS3 y EV. Para ello se crecieron las plantas en medio Fahraeus suplementado con KNO_3 como fuente de nitrógeno. A los 15 días se cuantificó la longitud de las RPs, RLs y se calculó la densidad de las RLs (número de RLs/cm de RP). La longitud de las RPs y la densidad de RLs no se vieron afectados por la sobreexpresión de *TAS3* (Figura 40 A. C. D.). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la longitud de las RLs en las plantas OXTAS3 en comparación con las RLs de las plantas control EV (Figura 40 B). Estos resultados demuestran que la variante *TAS3* estaría involucrada en la regulación del crecimiento de las RLs. Este fenotipo es similar al fenotipo de las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b descrito en el Capítulo I. Teniendo en cuenta que a partir de *TAS3* y mediante la acción de la proteína AGO7 asociada a miR390 se generan los tasiARFs, los resultados sustentan la función de la vía miR390/*TAS3* sobre el crecimiento de las RLs. Por otro lado, las raíces OXALTAS3 desarrollaron RPs significativamente más largas (aproximadamente 2 cm) en comparación con las plantas EV (Figura 40 E), la densidad de RLs no se encontró afectada y las RLs fueron levemente más largas, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 40 F-H). El fenotipo de raíz observado en plantas OXALTAS3 es reminiscente del observado previamente en las raíces MIM390 (Capítulo I), proveyendo aún más sustento a la hipótesis de que la isoforma *AL TAS3* podría actuar como *target mimicry* de miR390, contribuyendo a reducir los niveles de tasiARFs en etapas tempranas de la simbiosis.

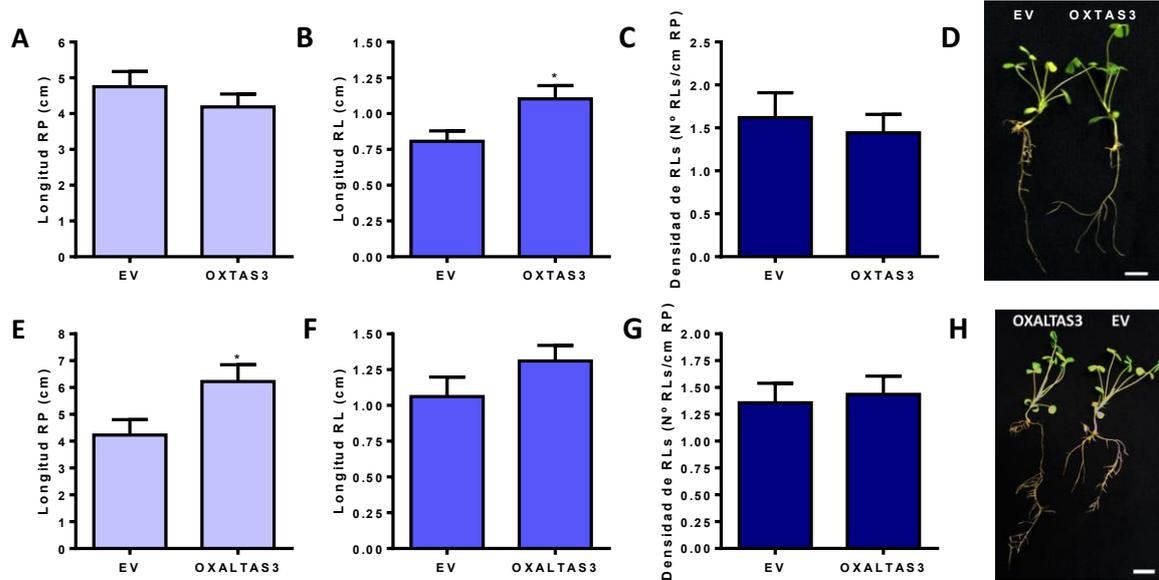


Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de las isoformas de *TAS3* sobre la arquitectura de raíces en *M. truncatula*. Longitud de las raíces principales (RP) (A y E), raíces laterales (RL) (B y F) y densidad de las RL (C y G) cuantificadas en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o las isoformas *TAS3* (OXTAS3) o *ALT TAS3* (OXALTAS3). Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas de experimentos independientes, con más de 30 raíces transgénicas por cada experimento. Los asteriscos indican que los valores son significativamente diferentes en un *test* t-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*). D y H. Fotografías ilustrativas de las plantas compuestas EV, OXTAS3 y OXALTAS3.

2.2. La isoforma *AL TAS3* promueve la formación de nódulos

Para analizar el efecto asociado a la nodulación desencadenado por la sobreexpresión de los transcritos *TAS3* y *AL TAS3* se cuantificó el número de raíces transgénicas OXTAS3, OXALTAS3 y raíces control EV con nódulos y la cantidad de nódulos por raíz a diferentes tiempos luego de la inoculación con *S. meliloti*. Se observó un mayor porcentaje de plantas noduladas a tiempos tempranos de la interacción simbiótica (6-13 dpi) tanto en las raíces OXTAS3 como en las OXALTAS3 en comparación con las plantas control EV (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje de plantas OXTAS3, OXALTAS3 y EV noduladas

Días post-inoculación	EV	OXTAS3	Días post-inoculación	EV	OXALTAS3
6	48 % (19/40)*	62 % (33/53)	7	22 % (7/32)	28 % (9/32)
9	55 % (19/40)	75 % (33/53)	11	38 % (12/32)	59 % (19/32)
13	68 % (19/40)	87 % (33/53)	15	50 % (16/32)	66 % (21/32)
16	85 % (19/40)	92 % (33/53)	22	78 % (25/32)	88 % (28/32)
19	92 % (19/40)	98 % (33/53)	25	81 % (26/32)	91 % (29/32)
23	95 % (19/40)	98 % (33/53)			
26	95 % (19/40)	98 % (33/53)			

Tabla 4. Porcentaje de plantas noduladas a diferentes días post-inoculación con *S. meliloti* 1021. Las cuales fueron transformadas con el vector vacío (EV) y que sobreexpresan el transcritto *TAS3* (OXTAS3) o *AL TAS3* (OXALTAS3). El porcentaje de plantas noduladas fue calculado como el número de plantas con nódulos dividido el número de plantas totales x 100. *Entre paréntesis se indica el número de plantas noduladas/número de plantas totales.

No se observaron diferencias significativas en el número de nódulos desarrollados en las raíces que sobreexpresan la isoforma *TAS3* respecto a las raíces control (Figura 41 A). Sin embargo, las raíces que sobreexpresan la isoforma corta *AL TAS3* desarrollaron un mayor número de nódulos por raíz transgénica en comparación con las plantas control a todos los tiempos analizados (Figura 41 B).

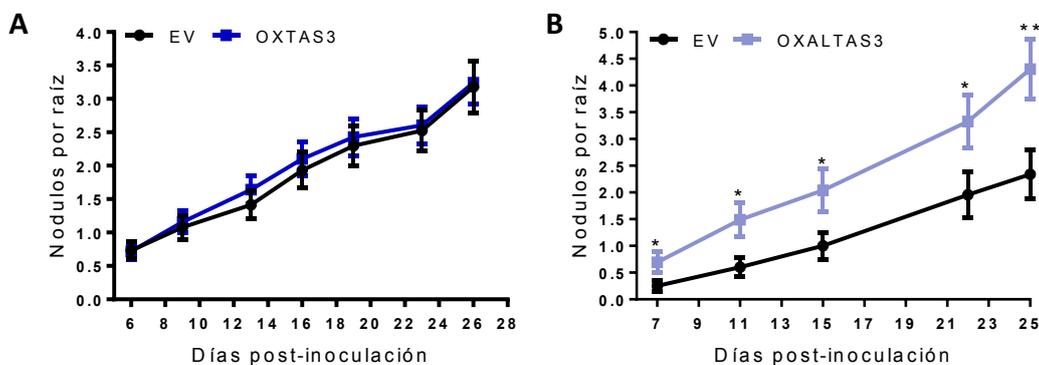


Figura 41. La sobreexpresión de la isoforma *ALT TAS3* promueve la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*. Nódulos formados por raíz transgénica en las plantas transformadas con el vector vacío (EV) o con las isoformas *TAS3* (OXTAS3 A) o *ALT TAS3* (OXALTAS3 B) a diferentes días luego de la inoculación con *S. meliloti* 1021. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar y los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos respecto a EV en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**). Los datos son representativos de 2 réplicas biológicas independientes con más de 96 raíces por construcción.

Con el fin de evaluar si los eventos de infección se encuentran afectados por la sobreexpresión de las diferentes variantes de *TAS3* se realizó la cuantificación del número de ITs y el análisis de su progresión hacia las células corticales en división, como se describió en el Capítulo I. La cuantificación se realizó a los 6 dpi de las raíces EV, OXTAS3 y OXALTAS3 con la

cepa de *S. meliloti* que expresa la proteína RFP. No se observaron diferencias estadísticas en la densidad de ITs (número de ITs por cm de raíz) ni en la progresión de los ITs en las raíces OXTAS3 comparadas con las raíces EV utilizadas como control (Figura 42 A-B). Por otro lado, las raíces que sobreexpresan la variante corta de *TAS3* (OXALTAS3) desarrollaron aproximadamente 46 % más ITs con respecto al control, pero la progresión de los ITs a través de las diferentes capas celulares no se vio alterada (Figura 42 C-D).

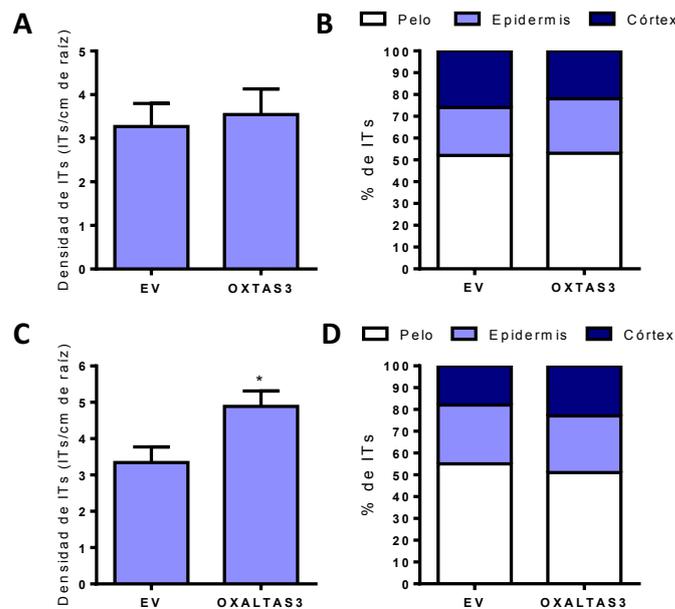


Figura 42. La sobreexpresión de la isoforma AL *TAS3* promueve un aumento de los eventos de infección en las raíces de *M. truncatula*. **A.** Cuantificación del número ITs por centímetro de raíz (densidad) en las raíces EV y OXTAS3 y **C.** en las raíces EV y OXALTAS3. **B.** Porcentaje de ITs que alcanzaron el pelo, epidermis o córtex en las raíces EV y OXTAS3 y **D.** en las raíces EV y OXALTAS3. Los datos corresponden a la media \pm el desvío estándar, con más de 20 raíces transgénicas para el ensayo de OXTAS3 y más de 30 raíces transgénicas para OXALTAS3. El asterisco indica que el valor OXALTAS3 es significativamente diferente del EV en un test t-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$.

Los resultados del fenotipo asociado a la nodulación observado en las plantas OXALTAS3 son semejantes a lo descrito previamente en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral para las plantas MIM390 o para las raíces mutantes *ago7*; sin embargo, a diferencia de los nódulos MIM390 y *ago7*, no se observaron nódulos con morfología o distribución espacial alterada en las raíces OXALTAS3 respecto a los nódulos control.

DISCUSIÓN

3. Discusión Capítulo II

Como se mencionó en la introducción, la vía miR390/*TAS3* presenta una gran conservación evolutiva y, dentro de esta vía, el *locus TAS3* en particular es el que presenta

mayor diferencia dentro del reino vegetal (Allen et al., 2005; Axtell et al., 2006). Como se mencionó previamente en la Introducción se han reportado dos genes *TAS3* denominados *TAS3-long (TAS3L)* y *TAS3-short (TAS3S)*. *TAS3L* posee los sitios 5' no clivable y 3' clivable de unión a miR390 y se procesa para generar dos tasiRNAs estables en fase (Allen et al., 2005; Axtell et al., 2006); por otro lado en *TAS3S* ambos sitios de unión de miR390 son clivables y conlleva a la producción de un único tasiRNA estable (Xia et al., 2012; Xia and Meyers, 2016). En *A. thaliana* se han descrito tres genes del tipo *TAS3L (TAS3-long (TAS3a/b/c))* que dan lugar a la producción de tasiARFs, mientras que el genoma de *M. truncatula* posee un solo locus *TAS3L* (Xia and Meyers, 2016). *TAS3L* se encuentra poco conservado a nivel de secuencia nucleotídica entre diferentes especies; sin embargo, posee algunas características muy conservadas. Entre ellas los sitios de unión 5' y 3' de miR390, las secuencias de los tasiARFs y la presencia de un pequeño ORF *upstream* al sitio 5' no clivable de miR390. La secuencia de aminoácidos del ORF no se encuentra conservada pero su tamaño varía entre 50-60 aminoácidos y se posiciona a 8-20 nts del 5' no clivable de miR390 en diferentes especies vegetales (Bazin et al., 2017). En *A. thaliana*, existen evidencias de que este pequeño ORF es necesario para la estabilización del transcripto *TAS3* mediante su asociación a polisomas y para la producción de tasiARFs (Hou et al., 2016; Yu et al., 2016; Bazin et al., 2017). En este capítulo verificamos la asociación de *TAS3* a polisomas en la leguminosa *M. truncatula* y además identificamos una nueva variante del transcripto de *TAS3 (AL TAS3)*. *AL TAS3* se asocia a los polisomas específicamente en raíces de *M. truncatula* en etapas tempranas (48 horas) de la interacción simbiótica con rizobios y es más corto que *TAS3* hacia el 5', perdiendo el sitio 3' clivable de miR390 pero conservando el sitio 5' no clivable. Cabe destacar que para la construcción de las bibliotecas se purificaron los RNA que contienen una cola de poliA mediante bolillas magnéticas conjugadas a oligo-dT, por lo cual es poco probable que las lecturas asignadas a la isoforma *AL TAS3* provengan del producto 5' de *TAS3* clivado por acción del miR390 y el complejo RISC.

Los resultados de este capítulo muestran que ambas variantes de *TAS3* tendrían una función en la regulación del crecimiento de las raíces. Por un lado, *TAS3* promueve el crecimiento de las RLs, mientras que *AL TAS3* controla positivamente el crecimiento de las RPs. Previamente, Marin y colaboradores (2010) mostraron que la sobreexpresión de *AtTAS3a*, ya sea bajo el promotor CaMV35S o por medio de una línea mutante activada en el locus *TAS3*, promueve el crecimiento de las RLs en *A. thaliana* (Marin et al., 2010). Por lo tanto, la función del transcripto *TAS3* en la arquitectura de la raíz estaría conservada *A. thaliana* y *M. truncatula*. La sobreexpresión de la variante *TAS3* no afectó el desarrollo de nódulos en las raíces de *M. truncatula*. A las 48 hpi los niveles de acumulación de miR390 disminuyen, por lo

tanto el factor limitante en la producción de tasiARFs podría ser miR390 y no *TAS3*, al menos en esta etapa temprana de la interacción simbiótica. Sin embargo, sería necesario medir los niveles de tasiARFs en las raíces OXTAS3 y EV para sustentar esta hipótesis. Por otro lado, la acumulación de transcripto *AL TAS3* en las raíces de *M. truncatula* generó un mayor número de nódulos con respecto al control. El fenotipo asociado a la arquitectura de raíz y nodulación causado por la expresión ectópica de *AL TAS3* es similar al fenotipo observado en las raíces MIM390 descrito en el Capítulo I. Teniendo en cuenta que *AL TAS3* conserva el sitio 5' no clivable de miR390 y los resultados previos, donde se muestra que la acumulación de miR390 y tasiARFs disminuyen en las muestras de RNA total, pero que miR390 aumenta en la muestra TRAP a las 48 horas post-inoculación con el rizobio (Mauricio Reynoso. Tesis Doctoral, 2013, UNLP) hemos propuesto un modelo que explica la función de las isoformas *TAS3* y *ALT TAS3* en etapas tempranas de la simbiosis (Figura 43). En este modelo, la isoforma *TAS3* es estabilizada por su asociación a polisomas debido a la presencia del pequeño ORF. La asociación de esta isoforma a polisomas da lugar a la producción de tasiARFs y la represión post-transcripcional de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* en raíces no inoculadas. Luego de la inoculación con *S. meliloti*, la isoforma *AL TAS3* asociada a polisomas actuaría como un *target mimicry* de miR390 endógeno que contribuye a reducir la producción de tasiARFs liberando la represión post-transcripcional de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, la cual es requerida para el progreso de la simbiosis. La similitud fenotípica encontrada en las raíces MIM390 y OXALTAS3 provee sustento a esta especulación. Sin embargo, a diferencia de los nódulos desarrollados en las raíces MIM390 y *ago7*, los nódulos OXALTAS3 no mostraron una morfología o distribución espacial alterada. Es probable que diferencias cuantitativas en la acumulación de los sRNA entre las plantas MIM390, *ago7* y OXALTAS3 afecten distinto los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, lo cual se ve reflejado en la morfología de los nódulos. Cabe destacar que existe una diferencia cuantitativa en el porcentaje de nódulos MIM390 y *ago7* multilobulados y desarrollados en *cluster*, y que las mutantes *ago7* presentaron un fenotipo más penetrante (Capítulo I). Sin embargo, cabe mencionar que no se puede descartar que la isoforma *ALT TAS3* esté involucrada en otros mecanismos de regulación de la simbiosis. Como perspectiva, la cuantificación de los niveles de acumulación miR390 y tasiARFs, así como también los niveles de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, en las raíces OXALTAS3 y EV contribuirían a esclarecer la función de la isoforma *AL TAS3* en el desarrollo de órganos laterales en *M. truncatula*.

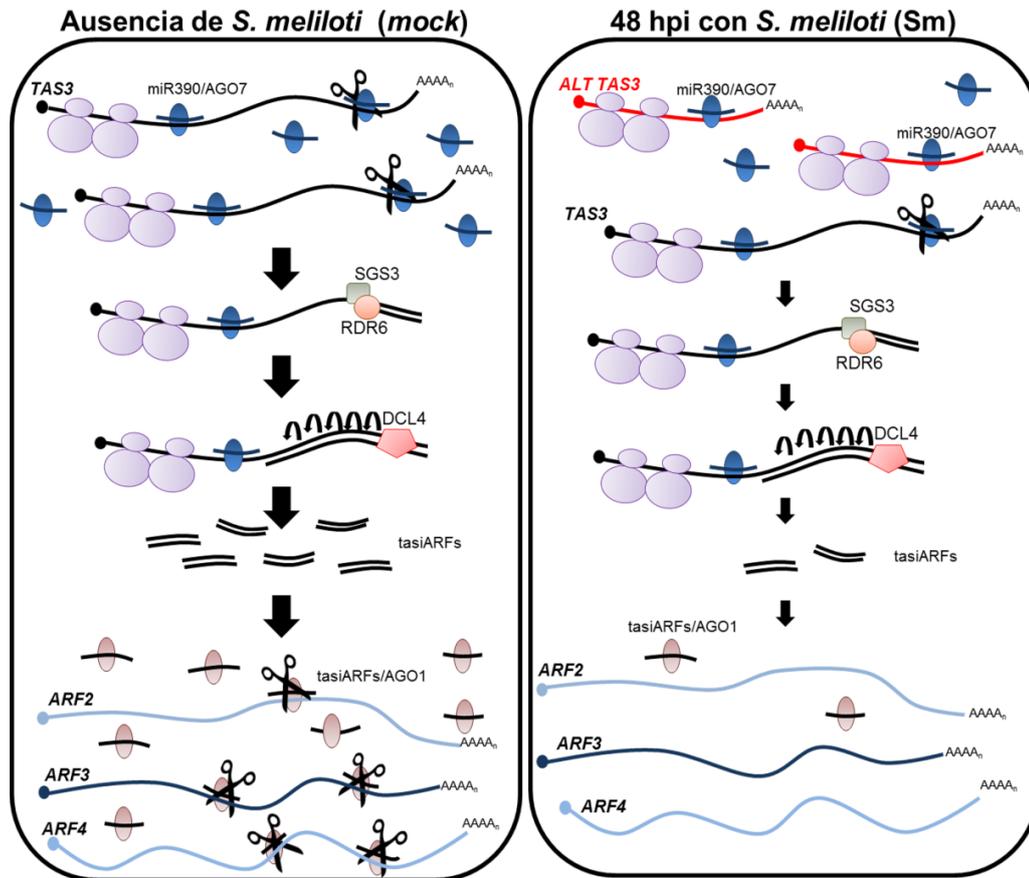


Figura 43. Esquema ilustrativo del modelo propuesto para la función de los transcritos *TAS3* y *AL TAS3* en el desarrollo de RLs y nódulos indeterminados en *M. truncatula*. El ORF de *TAS3* y *AL TAS3* permite la asociación de estos transcritos a los polirribosomas, probablemente para estabilizarlos (Hou et al., 2016; Yu et al., 2016; Bazin et al., 2017). A partir del transcripto *TAS3* y mediante la acción de clivaje de la proteína AGO7 (ilustrada en óvalos azules) asociada a miR390 se producen los tasiARFs, los cuales regulan post-transcripcionalmente los niveles de acumulación de los transcritos *ARF2/3/4* (Montgomery et al., 2008). La vía miR390/*TAS3* regula el crecimiento de las RLs en diferentes especies por un mecanismo aún desconocido (Marin et al., 2010; He et al., 2018, Capítulos I y II de este trabajo). Luego de 48 hpi con *S. meliloti* se acumula y se asocia a los polisomas el transcripto *AL TAS3*. En contraposición la isoforma *TAS3* disminuye su asociación a polisomas. *AL TAS3* actuaría como un *target mimicry* de miR390 endógeno, secuestrando a este miRNA y aumentando su asociación a polisomas (M. Reynoso. Tesis doctoral 2013, UNLP). En consecuencia, los niveles de miR390 libres disponibles disminuyen, limitando la producción de tasiARFs y liberando la represión de los factores de transcripción *ARF2/3/4*. Esta inactivación de la vía miR390/*TAS3* en etapas tempranas de la interacción simbiótica es necesaria para la organogénesis del nódulo y la iniciación de los eventos de infección (Capítulo I y II de este trabajo).

CAPÍTULO III

**Cambios transcriptómicos asociados
a la vía miR390/TAS3 en raíces de
*M. truncatula***

RESULTADOS

1. Diseño experimental

Con el objetivo de identificar genes de *M. truncatula* cuya expresión sea regulada por la vía miR390/TAS3 se evaluaron los cambios a nivel de transcriptoma desencadenados por la activación de la vía (i.e. sobreexpresión del miR390) mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) utilizando la tecnología Illumina. En la figura 44 se esquematiza el diseño experimental utilizado. Se generaron plantas compuestas que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390) o transformadas con el vector vacío (EV, *empty vector*), como control (detallado en el Capítulo I). Posteriormente, las raíces se inocularon con *S. melliloti* (Sm) o con agua (*mock*) y a las 48 horas post-inoculación (hpi) se colectó el tejido total de raíz. A este tiempo se inducen las respuestas moleculares asociadas a la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo (Reynoso et al., 2013). Con el fin de llevar adelante un análisis estadístico robusto y estimar la reproducibilidad de los datos obtenidos en la secuenciación se generaron tres replicas biológicas por condición, en cada una de las cuales se combinaron más de 48 raíces transgénicas (~ 16 plantas compuestas).

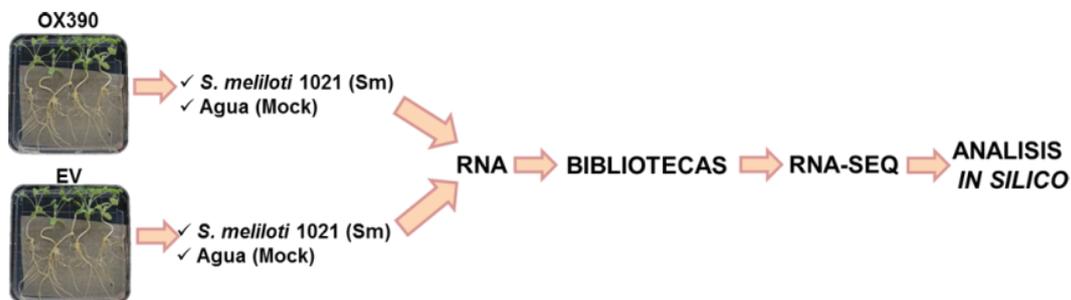


Figura 44. Esquema del diseño experimental utilizado. Las raíces transgénicas de las plantas compuestas OX390 y EV fueron inoculadas con agua (*mock*) como control o con *S. melliloti* 1021 (Sm). Al cabo de 48 horas post-inoculación se colectó el tejido de raíz, se extrajo RNA total de tres réplicas biológicas por condición, se purificó el RNA poliadenilado y se construyeron las bibliotecas para secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) utilizando la tecnología de Illumina. Los datos generados fueron analizados *in silico* para identificar genes y transcritos con expresión diferencial.

Para verificar la acumulación de miR390 en las raíces OX390 y la respuesta al rizobio en las raíces EV, se realizó la cuantificación de los niveles del miRNA maduro y del transcripto *ERN1* (*ERF Required for Nodulation1*) a partir del RNA total obtenido (Figura 45). En las raíces EV se observó una menor acumulación de miR390 y una mayor acumulación de *ERN1* las raíces inoculadas con rizobio respecto de las inoculadas con agua (*mock*), lo cual es coincidente con lo observado previamente en raíces WT (Capítulo I; Reynoso et al., 2013), verificando que las raíces están percibiendo al rizobio y desencadenando las respuestas moleculares requeridas

para la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo. Por otra parte, en las raíces OX390 se confirmó la sobreacumulación de miR390, tanto en las raíces *mock* como en las inoculadas con *S. meliloti*. Consistentemente con los resultados del Capítulo I, las raíces OX390 mostraron una mayor acumulación de los niveles de *ERN1* ya sea en la condición *mock* como en la inoculada con *S. meliloti*.

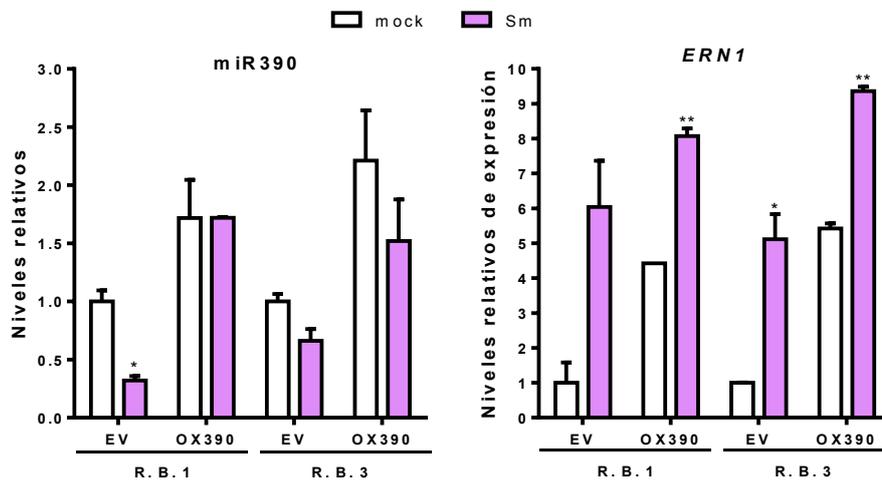


Figura 45. Niveles de acumulación del microRNA390 y *ERN1* en las raíces transgénicas OX390 y EV, y sus variaciones en respuesta a *S. meliloti*. La cuantificación de los niveles de miR390 y del transcripto *ERN1* se realizó mediante *stem-loop* RT-qPCR y RT-qPCR, respectivamente, en las raíces de *M. truncatula* EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación. Los niveles de miR390 fueron normalizados por los niveles del transcripto *U6* y los niveles de *ERN1* por *HISL3*. Los datos están expresados relativos a la condición EV *mock*. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican que los valores de las muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras *mock* en un *test* t-Student no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**). Se muestran los resultados de la réplica biológica 1 (R.B.1) y la réplica biológica 3 (R. B. 3).

2. Construcción de las bibliotecas, análisis de calidad y secuenciación

Previo a la construcción de las bibliotecas, se evaluó la integridad, calidad y concentración del RNA total obtenido para cada muestra mediante electroforesis capilar en un equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*. En todos los casos se obtuvieron muestras de RNA con un número de integridad de RNA (RIN, por *RNA integrity number*) igual o superior a 8, el cual es el valor mínimo recomendado por el proveedor del kit para la construcción de las bibliotecas (Illumina). En la figura 46 se muestran ejemplos de los electroferogramas obtenidos.

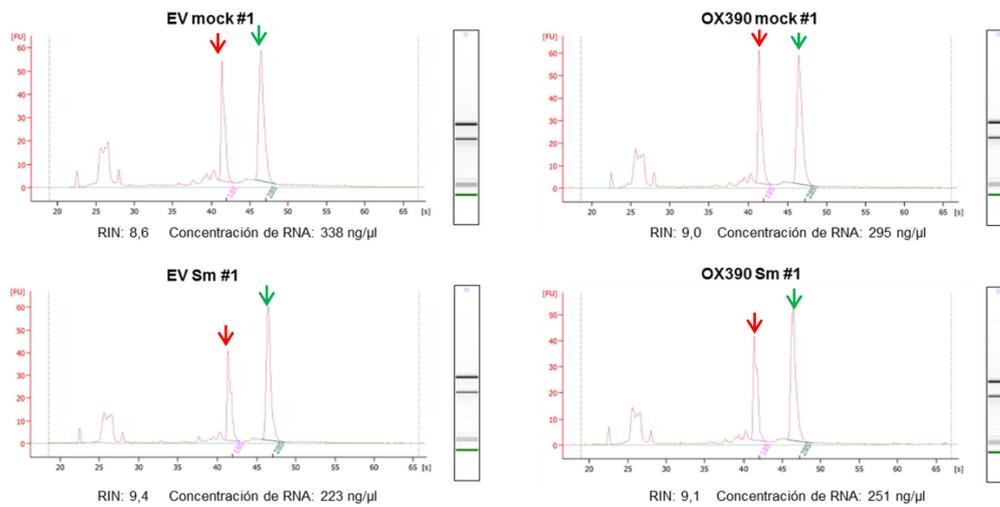


Figura 46. Control de calidad del RNA para la generación de las bibliotecas. Electroferogramas del RNA total generados a partir de electroforesis capilar en el equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*. El valor de RIN (*RNA integrity number*) indica la calidad e integridad del RNA. Las flechas rojas y verdes indican la posición de los RNA ribosomales 18S y 25S, respectivamente. Se muestra como ejemplo los resultados obtenidos para la réplica biológica 1.

Posteriormente, se procedió a la construcción de las bibliotecas siguiendo la metodología descrita por el proveedor (Illumina). Brevemente, se purificó el RNA poliadenilado, el cual fue fraccionado mediante tratamiento con cationes divalente y alta temperatura para obtener fragmentos de RNA de 200 nts en promedio. Los fragmentos de RNA fueron copiados a primera cadena de cDNA utilizando oligonucleótidos al azar y la transcriptasa reversa SuperScript II (Thermo Fisher). La segunda cadena de cDNA se llevó a cabo con RNAsa H y DNA polimerasa I. Luego se realizó la reparación de los extremos del cDNA y la adenilación de los extremos 3' del cDNA. Por último se ligaron los adaptadores específicos conteniendo un código de barras o *index* específico para cada biblioteca y se realizó una amplificación del cDNA mediante PCR utilizando 15 ciclos (Figura 47). Se utilizaron diferentes *index* para cada biblioteca con el objeto de secuenciar todas las bibliotecas en una única línea del secuenciador.

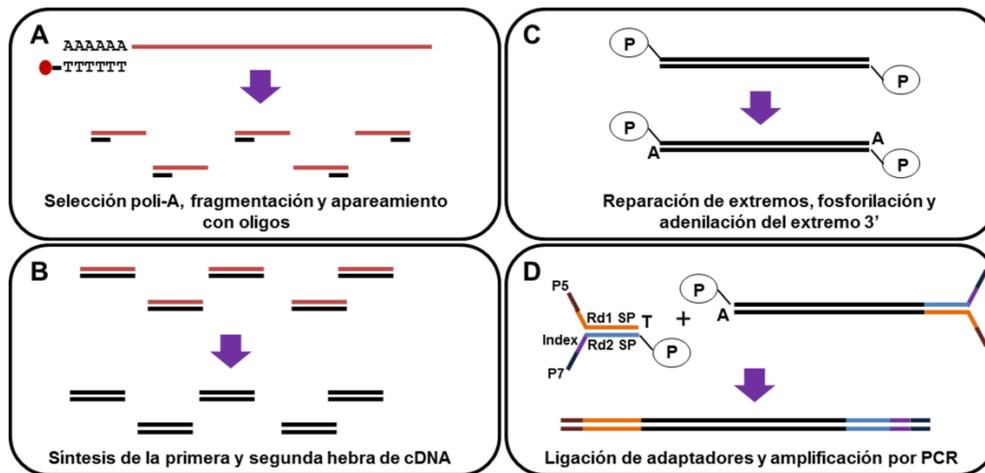


Figura 47. Esquema los pasos seguidos para generar las bibliotecas de cDNA para RNA-seq. A. Los RNAs poliadenilados fueron purificados utilizando bolillas magnéticas conjugadas a oligo-dT. El RNA purificado fue tratado con cationes divalentes a altas temperaturas para generar fragmentos de aproximadamente 200 nts, que luego fueron incubados con oligonucleótidos aleatorios. B. Se realizó la síntesis de la primera hebra de DNA utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Thermo Fisher). Luego, se realizó la síntesis de la segunda hebra de DNA utilizando RNasa H y DNA polimerasa I. C. Los fragmentos de DNA fueron procesados por reparación de los extremos utilizando el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I, seguido de la fosforilación de los extremos 5' y adenilación de los extremos 3' (necesarios para evitar la re-ligación y para la posterior ligación de adaptadores). D. Por último, se ligaron adaptadores específicos conteniendo un *index* específico y el cDNA se amplificó mediante PCR utilizando 15 ciclos. Las regiones P5 y P7 son necesarias para la adhesión de los fragmentos a las celdas durante la secuenciación. Rd1SP y Rd3SP son regiones complementarias a los *primers* de secuenciación. La secuencia del *index* permite identificar de qué muestra proviene el fragmento secuenciado. Adaptado de *Illumina Tru-seq RNA-seq protocol*.

Las bibliotecas fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 48 A). Se observaron fragmentos de cDNA en un rango de 250 a 500 pb, siendo mayoritarios los fragmentos de aproximadamente 300 pb. También pudo verificarse un enriquecimiento de aquellas moléculas de cDNA ligadas a los adaptadores y una mínima presencia de adaptadores libres o concatenados, lo que se evidencia como ausencia de bandas de pesos moleculares pequeños (menores a 150 pb). Luego, las bibliotecas se analizaron mediante electroforesis capilar en un equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*, corroborando los resultados de la electroforesis del gel de agarosa (Figura 48 B).

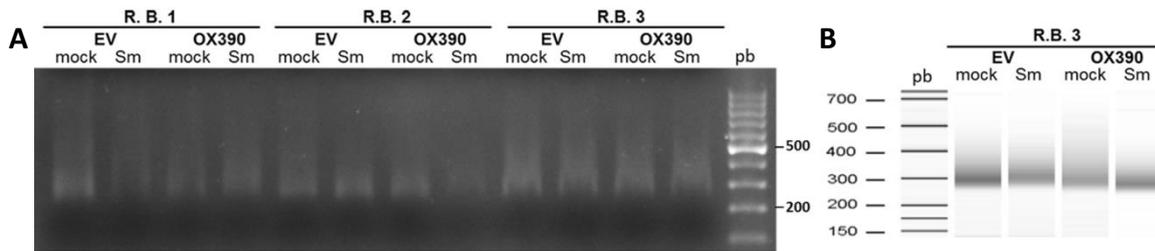


Figura 48. Distribución de tamaños de los fragmentos sintetizados para la construcción las bibliotecas. A. Electroforesis en un gel de agarosa 1,6 % revelado con bromuro de etidio. **B.** Electroforesis capilar de la réplica biológica 3 (R.B.3) en un equipo *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*. En ambas electroforesis se observan fragmentos mayoritarios entre 250 y 500 pares de bases (pb), con mayor intensidad en 300 pb.

El análisis cuali y cuantitativo de las bibliotecas generadas se realizó en el IPS2, Université de París Saclay, Francia, a partir de la colaboración establecida con el Dr. Crespi. La secuenciación se realizó en el mismo instituto utilizando un secuenciador HisSeq4000 (Illumina). Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación masiva se descartó la réplica biológica dos debido al bajo número de lecturas obtenido (aproximadamente 7 millones). Para las réplicas biológicas uno y tres se obtuvieron en promedio más de 25 millones de lecturas por biblioteca (Tabla 5). Se realizó un análisis de calidad de las lecturas obtenidas mediante la herramienta *FastQC* disponible en la plataforma gratuita *Galaxy* (<https://usegalaxy.org/>), la cual calcula los siguientes parámetros: valor medio de Q para cada base, índice de calidad por secuencia, contenido de GC por secuencia, el porcentaje de cada nucleótido para cada posición en la secuencia, el contenido de bases no identificadas (N) por secuencia, la distribución de tamaños de la secuencia, la cantidad de secuencias duplicadas y la existencia de *Kmers* sobrerrepresentadas (Tabla S. 1. Andrews et al., 2010). Cada base tiene asignado un *score* de calidad determinado por un algoritmo *Phred* (Ewing et al., 2005). Un alto *score* de calidad se correlaciona con una baja probabilidad de error y el valor Q30 indica un *score* equivalente a una precisión de 99,9 % (1 error cada 1000 bases). El análisis de calidad de las lecturas permitió demostrar que más del 81 % de las bases presentaron un *score* superior a Q30 y el Q promedio fue superior a 33 (Tabla 5). Estos resultados indican que la calidad de las lecturas obtenidas y su confiabilidad fueron las esperadas.

Tabla 5. Resultados de la secuenciación masiva

Muestra	Nº de lecturas	% lecturas alineadas	% de bases \geq Q30	Promedio de <i>score</i> de calidad
EV mock #1	24.340.087	82,4	84	34
EV Sm #1	17.309.434	80,9	81	33
OX390 mock #1	20.630.118	82,9	84	34
OX390 Sm #1	19.731.507	81,9	82	33
EV mock #3	28.610.470	82,8	84	34
EV Sm #3	33.540.946	83,8	84	34
OX390 mock #3	29.173.574	84,1	84	34
OX390 Sm #3	27.849.269	82,2	82	33
Promedio:	25.148.176	82,6	83	33,5

El análisis bioinformático de los datos de RNA-seq obtenidos se llevó a cabo aplicando el protocolo *Tuxedo* (Figura 49; Trapnell et al., 2012) utilizando la plataforma *Galaxy*. El primer paso consistió en el alineamiento de las lecturas de RNA-seq al genoma de referencia de *M. truncatula* (versión *Mt4.0*, Tang et al., 2014) utilizando el programa *TopHat2* (Kim et al., 2013). Este programa permite el alineamiento de las lecturas respecto al genoma de referencia, permitiendo a su vez 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, aún en genomas altamente repetitivos o con pseudogenes. Con esta herramienta se obtuvo un porcentaje promedio de 82,6 % de alineamiento de lecturas con el genoma de referencia (Tabla 5). A partir de los archivos generados por *TopHat2* se realizó el ensamblado de los transcritos utilizando el programa *Cufflinks*. Este programa permite también estimar la abundancia de los transcritos en la unidad FPKM (*Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*). Una vez obtenidos los archivos *Cufflinks* para cada muestra, los mismos se fusionaron mediante la herramienta *Cuffmerge*, la cual proporciona una base uniforme para calcular la expresión de genes y transcritos en cada condición. Por último, se realizó un análisis con el programa *Cuffdiff* para identificar genes y transcritos con expresión diferencial.

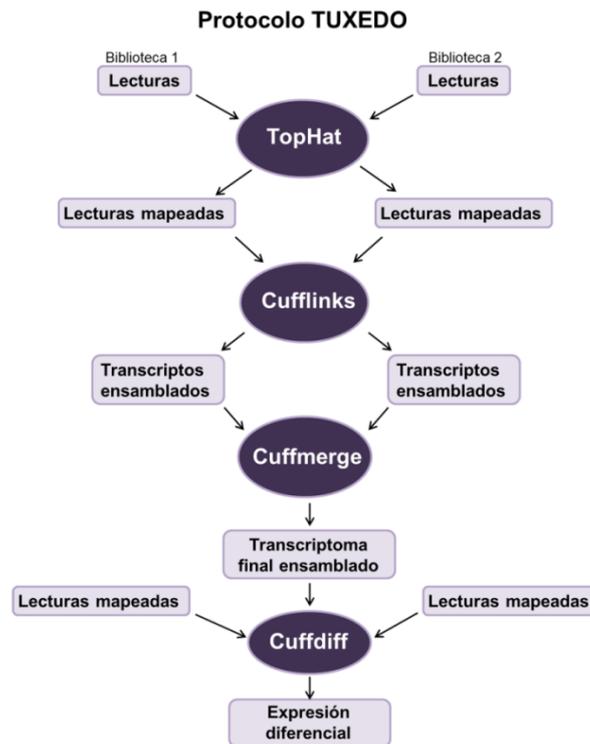


Figura 49. Esquema del análisis bioinformático TUXEDO para el análisis de los datos de RNAseq. El análisis TUXEDO fue realizado a través de GALAXY (<https://usegalaxy.org/>). *TopHat2*, *Cufflinks*, *Cuffmerge* y *Cuffdiff* fueron las herramientas utilizadas para obtener los resultados de expresión diferencial entre las muestras de raíz OX390 y EV inoculadas con agua o con *S. meliloti* 1021. Adaptado de Trapnell et al., 2012.

Para evaluar la correlación entre las réplicas biológicas uno y tres en cada condición se calculó el promedio de correlación. Este resultó en 0,85, el cual corresponde a un valor aceptable para continuar con el análisis teniendo en cuenta las dos replicas biológicas en cada condición (Figura 50 A). Por otro lado, el análisis de componentes principales de los datos de expresión obtenidos muestra que los perfiles transcritómicos de las raíces OX390 y EV tienden a agruparse por el tipo de tratamiento (*mock* o inoculadas con el rizobio) más que por el genotipo de las raíces (Figura 50 B).

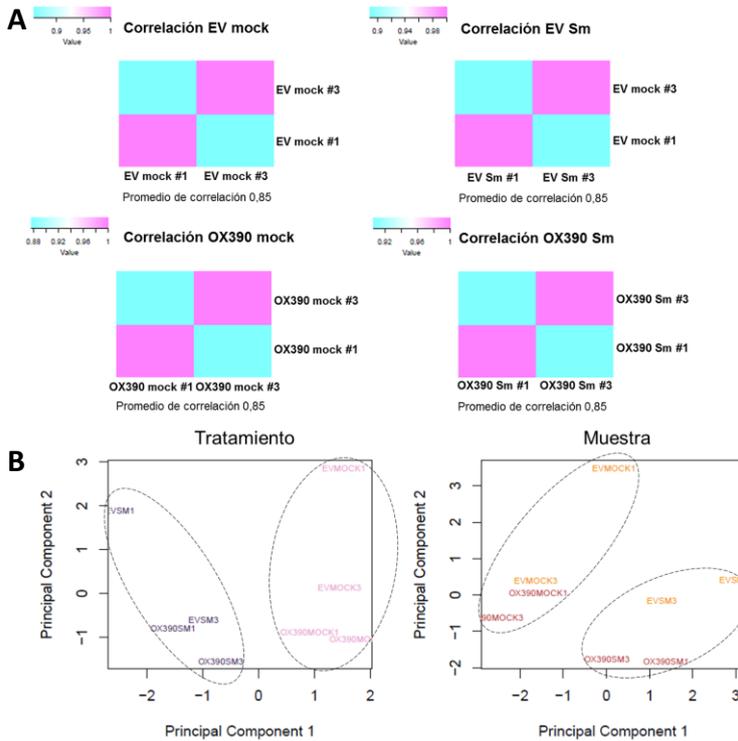


Figura 50. A. Correlación entre réplicas biológicas. *Heatmaps* representando el grado de correlación entre las réplicas biológicas 1 y 3 para las muestras EV *mock*, EV Sm, OX390 *mock* y OX390 Sm, obtenidos a partir de los datos de expresión. Se muestra el promedio de correlación para cada muestra. **B. Agrupamiento de los perfiles transcriptómicos de las raíces EV y OX390.** Análisis de componentes principales utilizando el método de correlación. Las muestras se agrupan principalmente según tratamiento (inoculado con agua (*mock*) o *S. meliloti* (Sm)), Las réplicas biológicas se muestran por separado. Las líneas punteadas señalan el agrupamiento.

De los 69.237 genes anotados en el genoma de *M. truncatula* (versión *Mt4.0*, Tang et al 2014), 23.613 mapearon con un FPKM mayor o igual a 1 en al menos una de las bibliotecas analizadas. Se realizó un gráfico de *boxplot* para determinar la mediana y la dispersión de los valores de FPKM obtenidos para cada condición (Figura 51 A). Los resultados muestran que la distribución de los valores de expresión fue similar entre las distintas muestras y tratamientos. Paralelamente, se realizaron diagramas *volcano* para visualizar la presencia de genes con expresión diferencial (GEDs) y la significancia estadística ($p \leq 0,05$, $fold\ change \geq 2$) en las comparaciones múltiples a nivel global (Figura 51 B).

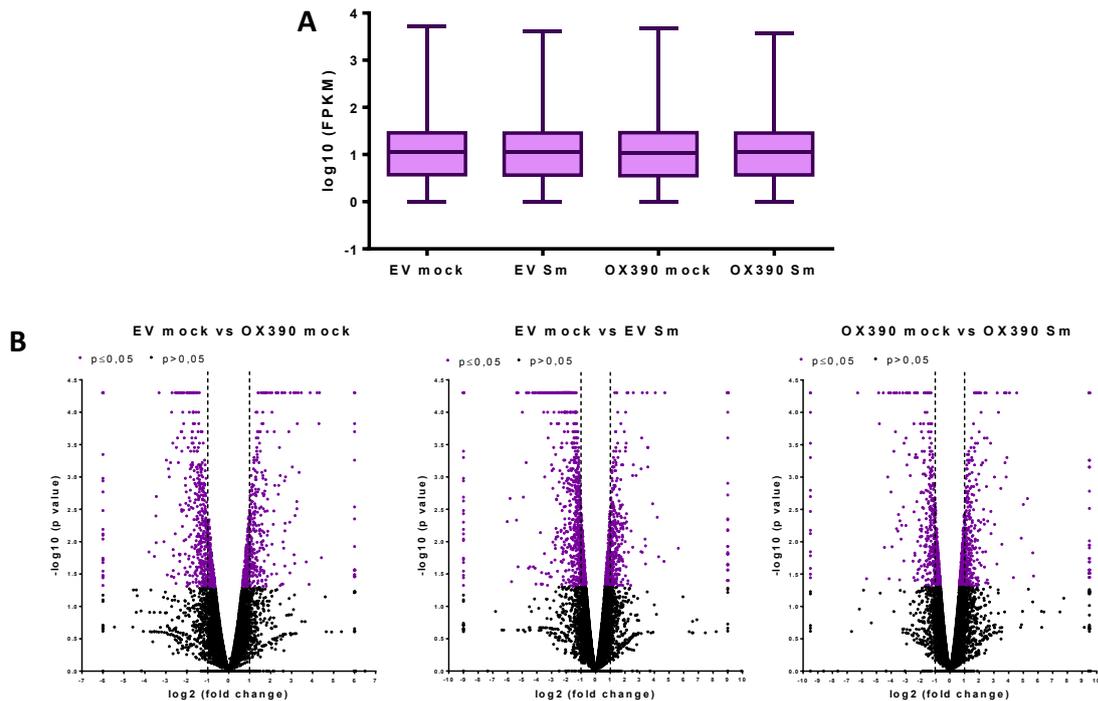


Figura 51. A. Distribución de los valores de FPKM obtenidos a partir de los datos de RNA-seq. (A) Boxplots de las distribuciones de los valores de expresión (FPKM) en las muestras (incluyendo las réplicas biológicas uno y tres) de raíces transformadas con el vector vacío (EV) y raíces que sobreexpresan el pre-miR390 (OX390) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 hpi. **B. Cambios en el transcriptoma de las raíces OX390 y EV.** Se muestran los cambios transcripcionales en un gráfico *volcano* de las raíces OX390 respecto a las raíces EV en ausencia del rizobio, raíces EV Sm con respecto a las raíces EV *mock* y raíces OX390 Sm respecto a las raíces OX390 *mock*. Cada punto representa un gen. El eje x corresponde al logaritmo en base 2 (log₂) 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 violetas refieren a genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Los puntos ubicados a la derecha de cero en el eje x son genes regulados positivamente. Los genes a la izquierda de cero corresponden a genes regulados negativamente. La línea punteada señala el log₂ (*fold change*) igual a -1 y 1, los puntos ≤ -1 y ≥ 1 corresponden a genes con un *fold change* ≥ 2 .

Con el fin de verificar si la activación de la vía miR390/*TAS3*, a través de la sobreexpresión de miR390, resultaba en una menor acumulación de sus *targets* finales *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* se analizaron los niveles de acumulación de dichos ARFs a nivel de gen y de las diferentes isoformas de transcriptos y además se visualizó la cobertura del número de lecturas para cada gen y los modelos génicos utilizando la herramienta IGV (*Integrative Genomes Viewer*, Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013). El IGV permite la visualización e integración de grandes conjuntos de datos genómicos a partir de los archivos generados a través de RNA-seq.

Se identificaron dos isoformas alternativas para el *locus* de *ARF2*. Ambas isoformas poseen dos sitios de unión de tasiARFs (Figura 52 C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de acumulación a nivel de gen entre las raíces que sobreexpresan el miR390 (OX390) y las control EV (Figura 52 A). Para el caso del transcripto *ARF2.2* se observó una disminución de sus niveles de aproximadamente 50% en las raíces

OX390 respecto de las EV en la condición *mock*, mientras que para *ARF2.1* no se detectaron diferencias significativas entre ambos genotipos en ninguna de las dos condiciones (Figura 52B). Para ninguno de los transcritos se observó una mayor acumulación en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.

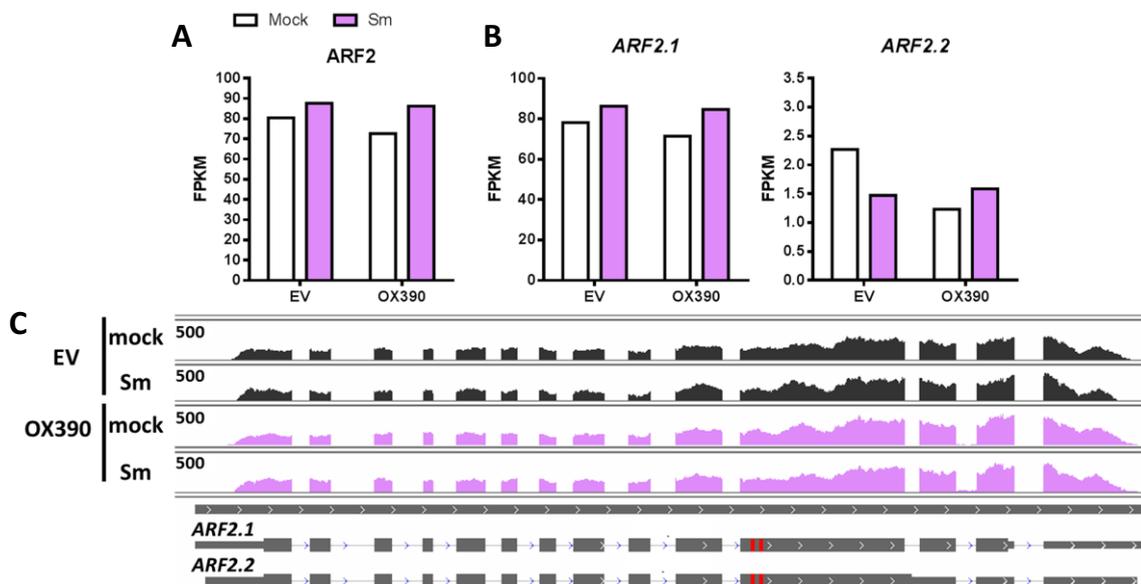


Figura 52. Niveles de expresión del factor de transcripción *ARF2*. A-B. Valores FPKM del gen *ARF2* (A) y de los distintos transcritos (B) en las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas) a las 48 hpi. C. Imagen obtenida del IGV donde se muestra la cobertura del número de lecturas para el gen *ARF2* y el modelo propuesto para los transcritos. Los rectángulos rojos corresponden a los sitios de unión de los tasiARFs.

Tanto en la condición *mock* como en raíces inoculadas se observó una disminución en los niveles de *ARF3* (24 % menos en *mock* y 27 % menos en muestras Sm) a nivel de gen en las raíces OX390 respecto a las raíces control (Figura 53 A). El análisis a nivel de transcritos reveló dos isoformas alternativas para *ARF3*. El transcripto *ARF3.1* contiene dos sitios de unión de tasiARFs, mientras que *ARF3.2* posee un solo sitio (Figura 53 C). Solamente la isoforma *ARF3.2*, mostró una inducción específica frente a la inoculación con *S. meliloti* en las raíces EV, la cual se encontró reprimida en las raíces que sobreexpresan el miR390 (Figura 53 B).

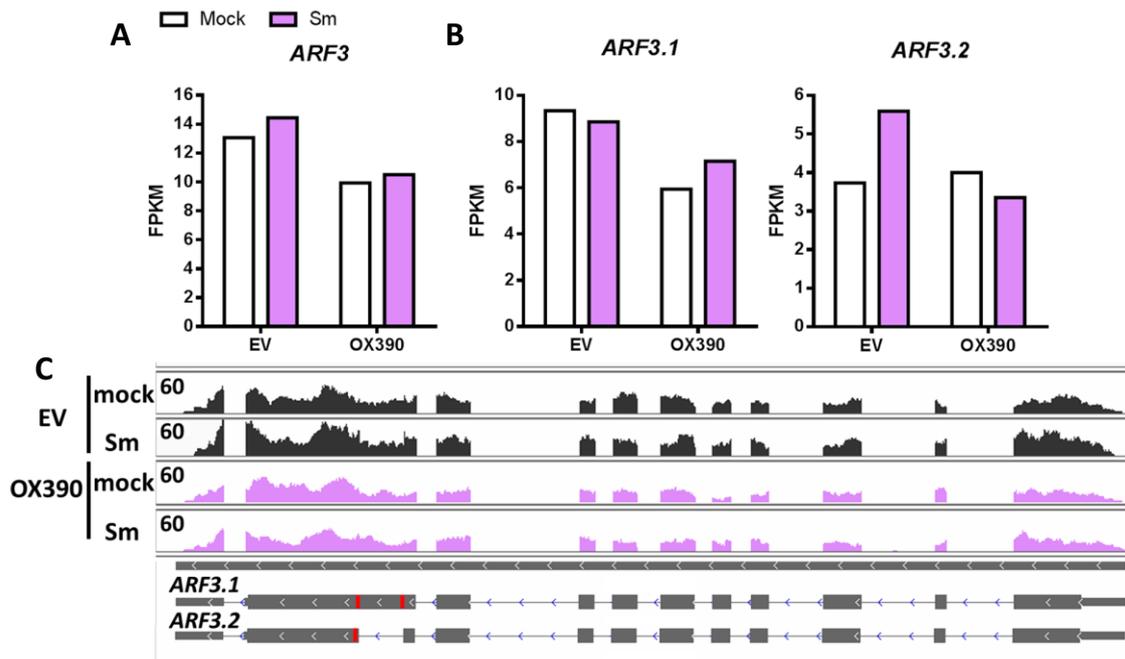


Figura 53. Niveles de expresión del factor de transcripción *ARF3*. A-B. Valores FPKM del gen *ARF3* (A) y de los distintos transcritos (B) en las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas) a las 48 hpi. C. Imagen obtenida del IGV donde se muestra la cobertura del número de lecturas para el gen *ARF3* y el modelo propuesto para los transcritos. Los rectángulos rojos corresponden a los sitios de unión de los tasiARFs.

A nivel de gen *ARF4a* mostró una disminución de 11,5 % menos en la condición *mock* y 25 % menos en Sm en las raíces OX390 respecto a las raíces control (Figura 54 A). Se detectaron dos transcritos alternativos de *ARF4a*, ambos con dos sitios de unión de tasiARFs (Figura 54 B-C). *ARF4a.1* se acumula en respuesta al rizobio en las raíces control y dicha inducción se encontró reprimida en las raíces OX390 (Figura 54 B). Por otra parte, *ARF4a.2* mostró una dramática represión en respuesta al rizobio en las raíces EV, así como también una disminución de sus niveles de más del 50% en las raíces OX390 respecto de las EV en la condición *mock*.

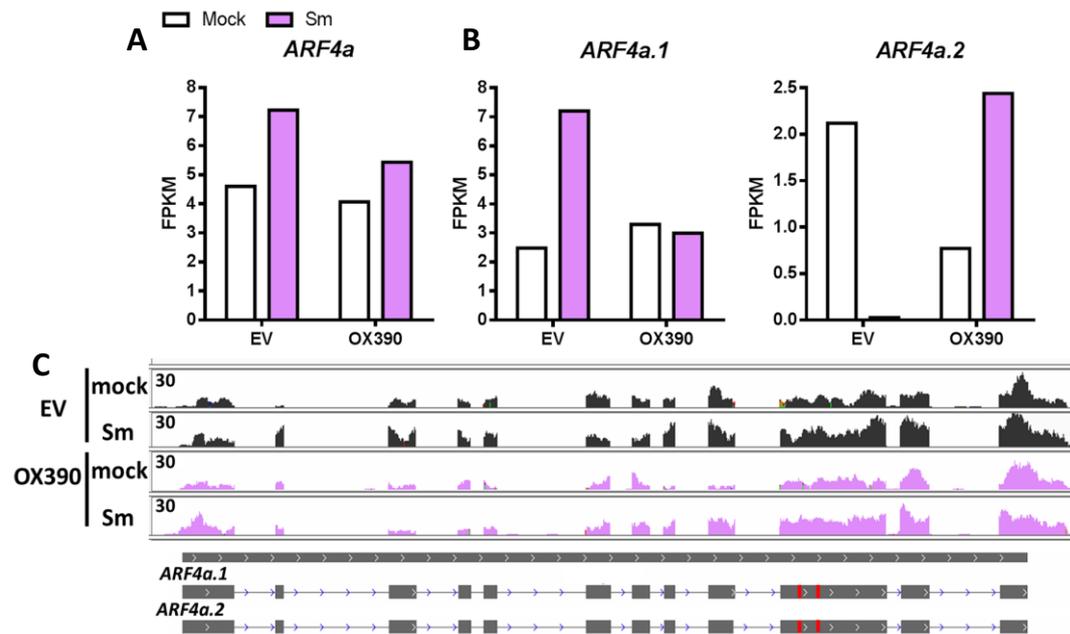


Figura 54. Niveles de expresión del factor de transcripción *ARF4a*. A-B. Valores FPKM del gen *ARF4a* (A) y de los distintos transcritos (B) en las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas) a las 48 hpi. C. Imagen obtenida del IGV donde se muestra la cobertura del número de lecturas para el gen *ARF4a* y el modelo propuesto para los transcritos. Los rectángulos rojos corresponden a los sitios de unión de los tasiARFs.

Por otro lado, *ARF4b* también mostró una disminución en sus niveles (23 % menos en *mock* y 15% menos en muestras Sm) a nivel de gen en las raíces OX390 respecto a las raíces control (Figura 55 A). Se detectaron diez transcritos diferentes para el *locus ARF4b*, todos con un único sitio de unión de tasiARFs (Figura 55 B-C). Solamente las isoformas *ARF4b.1*, *ARF4b.2*, *ARF4b.4*, *ARF4b.5*, *ARF4b.8*, *ARF4b.9* y *ARF4b.10* mostraron una inducción específica frente a la inoculación con *S. meliloti* en las raíces control. Esta inducción en los niveles de expresión de *ARF4b.8* y *ARF4b.9* se encontró reprimida en las raíces que sobreexpresan el miR390 (Figura 55 B).

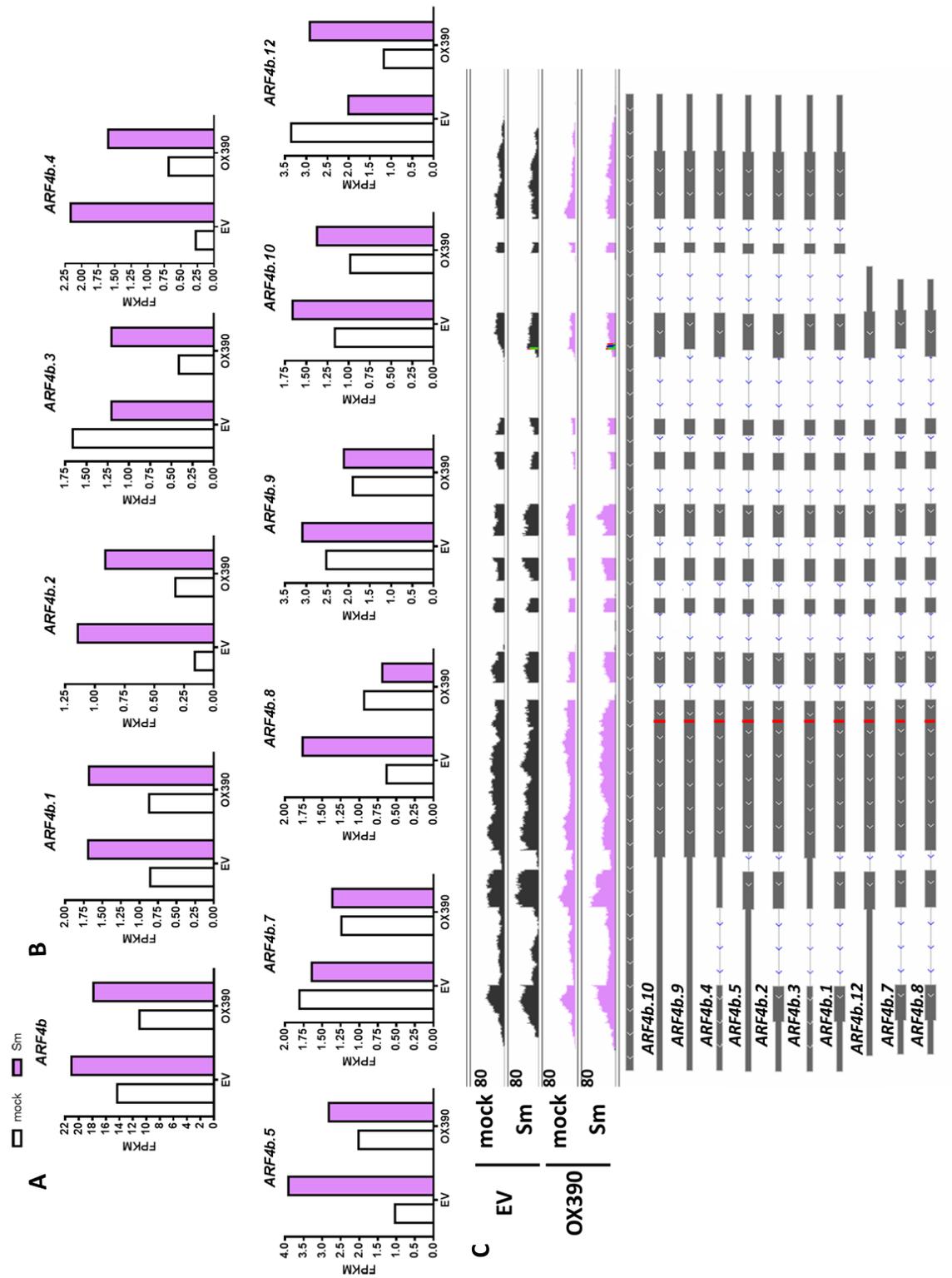


Figura 55. Niveles de expresión del factor de transcripción *ARF4b*. A-B. Valores FPKM del gen *ARF4b* (A) y de los distintos transcritos (B) en las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas) a las 48 hpi. C. Imagen obtenida del IGV donde se muestra la cobertura del número de lecturas para el gen *ARF4b* y el modelo propuesto para los transcritos. Los rectángulos rojos corresponden a los sitios de unión de los tasiARFs.

Estos resultados sugieren una especificidad en la acumulación a nivel de transcritos de *ARF3* y *ARF4a/b* en respuesta al rizobio y también en la regulación de estos transcritos por la vía *miR390/TAS3*.

Posteriormente, con el objetivo de corroborar que efectivamente haya ocurrido la reprogramación transcripcional esperada en respuesta a *S. meliloti* en las muestras que fueron sometidas a RNA-seq, se analizó la acumulación de los genes marcadores de nodulación *NF-YA1*, *NIN*, *PMI* (*pectin methylesterase inhibitor*), *AAT* (*transmembrane amino acid transporter family protein*), *ARP* (*ankyrin repeat RF-like protein, putative*), *ERN1*, *RIP3* (*Rhizobial Induced Peroxidase*), *EXPB1* (*expansin-like protein B1*), *NSP1* y *NSP2*. Las raíces control EV mostraron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de acumulación de estos marcadores luego de 48 hpi con *S. meliloti*, indicando la exitosa iniciación de la interacción simbiótica. Por otro lado, las raíces OX390 exhibieron un aumento en los niveles de expresión de los marcadores, el cual fue estadísticamente significativo sólo para *NF-YA1*, *NIN*, *PMI*, *ATT* y *ARP*. Cabe destacar que los datos de RNA-seq no mostraron cambios importantes ni estadísticamente significativos para los transcritos *ERN1*, *NSP1* y *NSP2* en las muestras OX390 (Figura 56). Estos resultados son consistentes con lo observado previamente mediante RT-qPCR (Capítulo I).

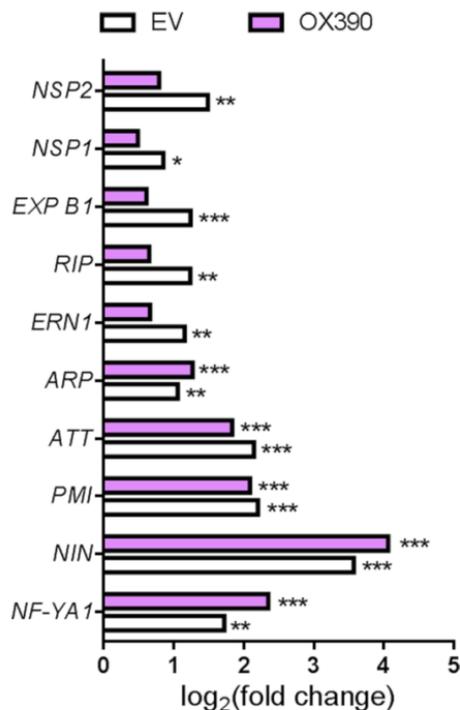


Figura 56. Niveles de expresión de genes marcadores de la nodulación. Se muestran los valores del logaritmo en base 2 del *fold change* entre las muestras EV inoculadas con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación, respecto a las muestras EV inoculadas con agua (mock) como control (barras blancas), y entre las muestras OX390 Sm respecto a las muestras OX390 mock (barras violetas). Los asteriscos indican que los valores de las muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes de las muestras mock con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) de acuerdo al análisis realizado con el algoritmo *Cuffdiff*.

3. Cambios transcripcionales asociados a la sobreexpresión de miR390

Con el objetivo de identificar genes que se encuentren afectados en su expresión a nivel de transcripto por la activación de la vía miR390/TAS3 mediante la sobreexpresión del pre-miR390b, se realizaron comparaciones sistemáticas de a pares entre todas las condiciones utilizando la herramienta *Cuffdiff*. Entre los archivos que genera *Cuffdiff* se encuentran tablas con los valores de FPKM para cada gen y transcripto (Tablas S. 2 y S. 3) en cada condición y en cada réplica biológica, así como también las comparaciones sistemáticas de a pares para todos los genes y transcriptos y los valores p y q (valor de p ajustado por el *false discovery rate* (FDR)), los cuales determinan la significancia estadística de las diferencias (Tabla S. 4 y S. 5). De las seis posibles comparaciones de a pares entre todas las muestras de RNA-seq se decidió seguir adelante con el análisis de tres comparaciones debido a su relevancia biológica. La primera comparación involucra el cambio transcripcional generado por la sobreexpresión del pre-miR390b en las raíces en ausencia de rizobio, es decir el análisis entre las muestras EV *mock* versus (vs) OX390 *mock*. Esta comparación resulta interesante ya que en el Capítulo I observamos que miR390 promueve el crecimiento de las RLs por lo tanto podríamos identificar posibles genes involucrados en el desarrollo de las RLs. La segunda y tercera comparación de interés estuvo dirigida a evaluar los cambios transcripcionales de las raíces control EV y OX390 en respuesta al rizobio (EV *mock* vs EV *Sm* y OX390 *mock* vs OX390 *Sm*, respectivamente). Mediante el análisis de estas dos comparaciones podríamos identificar posibles genes cuyos niveles de expresión sean regulados positiva o negativamente a las 48 hpi con *S. meliloti* en las raíces EV y que esta regulación se vea afectada por la sobreexpresión de miR390.

Con el fin de definir un criterio de diferencialidad robusto se seleccionaron como genes con expresión diferencial (GEDs) aquellos que presentaron un valor de FPKM mayor o igual a 1 en al menos una muestra, un *fold change* mayor a 2, un valor $p \leq 0,05$ y q (FDR) $\leq 0,5$. De esta manera, se detectaron un total de 1.801 GEDs en las comparaciones sistemáticas de a pares entre las muestras EV *mock* vs OX390 *mock*, EV *mock* vs EV *Sm* y OX390 *mock* vs OX390 *Sm* (Tabla S. 6). A partir de estos GEDs se realizaron gráficos de *heatmap* con los valores de FPKM para cada gen (Figura 57). Estos gráficos permiten visualizar los valores individuales de FPKM para cada GED en las diferentes condiciones, contenidos en una matriz y representados por colores. Se aplicó un criterio de agrupación de enlace promedio (*average linkage*) para cada fila y el método *Pearson* para la determinación de la distancia (*distance measurement method*). Este análisis permitió visualizar grupos de GEDs regulados homo-direccionalmente

entre las muestras OX390 y EV en respuesta al rizobio, es decir GEDs regulados positiva o negativamente en ambas muestras frente a la inoculación con el rizobio, así como también GEDs regulados hetero-direccionalmente, esto es regulados positivamente en una condición y negativamente en la otra condición o viceversa. Además, se observan GEDs cuyos niveles disminuyen o aumentan en las raíces que sobreexpresan el miR390 en comparación con las raíces EV en ausencia del rizobio.

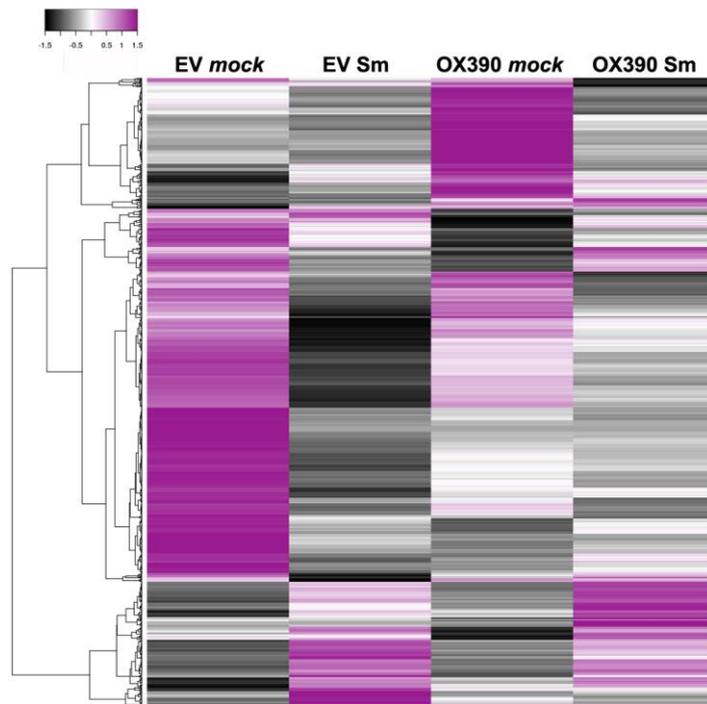


Figura 57. Niveles de expresión de los genes expresados diferencialmente (GEDs). Se muestra un gráfico de *heatmap* representando los valores de FPKM para los GEDs totales obtenidos de las comparaciones sistemáticas de a pares entre las muestras EV mock vs OX390 mock, EV mock vs EV Sm y OX390 mock vs OX390 Sm. La escala de colores representa el \log_2 de los FPKM.

En la figura 58 se muestran los números de GEDs totales para las comparaciones de a pares que resultaron de interés, es decir cuántos de estos GEDs mostraron mayores o menores niveles de acumulación en las raíces OX390 respecto a las EV en condiciones *mock* (Figura 58 A) y cuántos GEDs se encontraron regulados positiva o negativamente en las raíces EV o OX390 en respuesta al rizobio (Figura 58 B, Tablas S. 7 y S. 8). Cabe destacar que en las comparaciones entre las raíces OX390 y EV nos referimos a diferencias en los niveles de acumulación ya que las raíces son genéticamente diferentes.

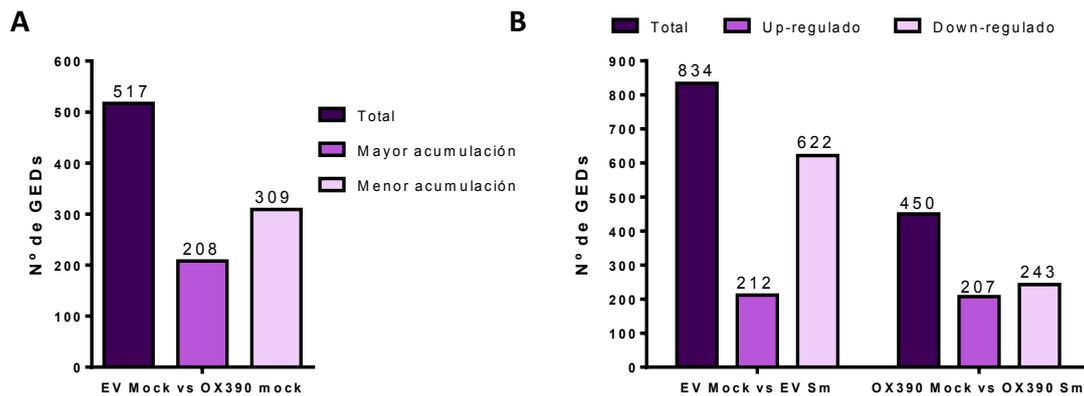


Figura 58. Genes con expresión diferencial (GEDs) en comparaciones de a pares. A. Se muestra el número GEDs para las comparaciones de a pares: EV mock versus OX390 mock y **B.** EV mock versus EV Sm y OX390 mock versus OX390 Sm.

Este análisis demuestra que la sobreexpresión ectópica de miR390 en ausencia del rizobio afecta la expresión de más de 500 genes en las raíces de *M. truncatula* respecto a las raíces control (Figura 58 A). Teniendo en cuenta el fenotipo de raíz en las plantas compuestas OX390, se podría especular que dentro de estos GEDs se incluyan genes que participen en el desarrollo y/o elongación de las RLs. Por otro lado, las raíces EV sufren una importante reprogramación transcripcional en respuesta a *S. meliloti*, con más de 800 GEDs de los cuales el 75 % son regulados negativamente. En las raíces que sobreexpresan miR390 también ocurre una importante reprogramación en respuesta a *S. meliloti*. Sin embargo, esta reprogramación es menor, con sólo 450 DEGs, en comparación con la respuesta transcripcional desencadenada por los rizobios en las raíces EV. Cabe destacar que las raíces OX390 mostraron aproximadamente un 40 % menos GEDs regulados negativamente en respuesta al rizobio comparado con el las EV (Figura 58 B).

4. *Targets* putativos de la vía miR390/TAS3 en el desarrollo de raíces laterales

Debido a que la sobreexpresión ectópica de miR390 en ausencia del rizobio afecta la expresión génica en las raíces de *M. truncatula* respecto a las raíces control y teniendo en cuenta el fenotipo de raíz observado en las plantas compuestas OX390, se podría especular que dentro de los genes expresados diferencialmente se incluyan genes que participen de la elongación de las RLs, por lo tanto se decidió analizar los GEDs en esta condición.

Con el objetivo de determinar si el cambio en la expresión génica provocado en las raíces OX390 afecta alguna categoría funcional específica, se realizó una clasificación funcional basada en el GO (*gen ontology*) seguido de una inspección manual de los GEDs en las raíces

OX390 respecto a las raíces EV (Figura 59). Las categorías más representadas para los GEDs cuyos niveles se encontraron aumentados en respuesta a la sobreexpresión de miR390 fueron proteínas con función desconocida y genes involucrados en el metabolismo (Tabla S.7). Estas mismas categorías, así como también genes agrupados en las categorías percepción y señalización, transporte y regulación transcripcional se encontraron enriquecidas para los GEDs que mostraron una acumulación menor en las raíces OX390 respecto a las EV (Tabla S. 8).

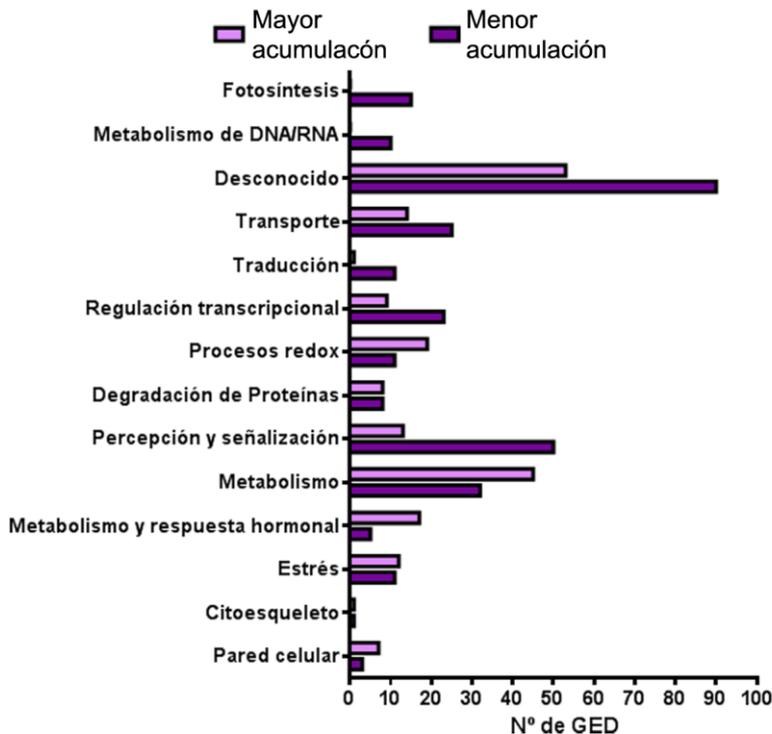


Figura 59. Clasificación funcional de los genes regulados diferencialmente en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390. La clasificación de los genes con expresión diferencial (GEDs) entre las raíces OX390 y EV tratadas con agua (mock), dentro de las diferentes categorías funcionales fue realizada en base al GO (*Gene Ontology*) y manualmente. Se muestran la clasificación funcional de los genes con niveles aumentados en las raíces OX390 respecto a las raíces EV (barras violeta claro) y de los genes con niveles de acumulación menor en las raíces OX390 respecto a las raíces EV (barras violeta oscuro).

Teniendo en cuenta que las hormonas están involucradas en la regulación de procesos de desarrollo se analizó en más detalle la categoría “metabolismo y respuesta hormonal”. Se detectaron 24 DEGs que pertenecen a la categoría metabolismo, señalización y respuesta a diferentes hormonas, los cuales se encuentran en su mayoría (18 DEGs) regulados positivamente en las raíces OX390 comparadas con las raíces EV. Los genes pertenecientes a las vías de síntesis y respuesta a auxinas, etileno y ácido jasmónico son los predominantes dentro de esta categoría (Tablas S. 7 y S. 8). Consistentemente con el incremento de la sensibilidad y/o respuesta a auxinas observadas en las raíces OX390 mediante el reportero DR5:GFP en el Capítulo I, identificamos tres genes de respuesta a auxinas que aumentan sus niveles de acumulación en las raíces OX390 respecto a las EV (Figura 60). Entre ellos un gen que codifica la proteína *IAA-amino acid hydrolase ILR1-like protein* (Medtr2g100560), la cual hidroliza ácido Indolacético (IAA) conjugadas a aminoácidos produciendo la liberación de IAA. En *A. thaliana* se ha reportado que esta familia de hidrolasas regula el crecimiento de las raíces

(Rampey et al., 2004; Sanchez Carranza et al., 2016). Los otros dos genes, Medtr4g010340 y Medtr4g072250, codifican las proteínas *Auxin-binding protein ABP19a* y *SAUR-like auxin-responsive protein*, respectivamente. Llamativamente, otros dos GEDs (Medtr2g041550 y Medtr3g084250) pertenecientes a las familias *Auxin-binding protein ABP19a* y *SAUR-like auxin-responsive protein* mostraron niveles reducidos en las raíces que sobreexpresan el miR390.

Con respecto al etileno, la sobreexpresión de miR390 estaría regulando dos genes implicados en la biosíntesis de la hormona (Figura 60). Medtr3g088565, el cual codifica la enzima *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*, se acumula a mayores niveles en las raíces OX390 que en las control. El gen Medtr7g079080 codifica la enzima *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase*, perteneciente a la misma vía de síntesis de etileno. Llamativamente, este gen mostró un patrón de expresión inverso. Por otro lado, los niveles de expresión de los factores de transcripción que responden a etileno, *ethylene response factor* (Medtr1g069960) y *ethylene-responsive transcription factor ERF026* (Medtr1g101550), se encontraron menos acumulados en las raíces OX390 con respecto a las raíces EV. A su vez, los niveles de expresión de todos los GEDs implicados en la síntesis y respuesta al ácido jasmónico se encontraron aumentados en las raíces OX390 respecto a las raíces control (Figura 60).

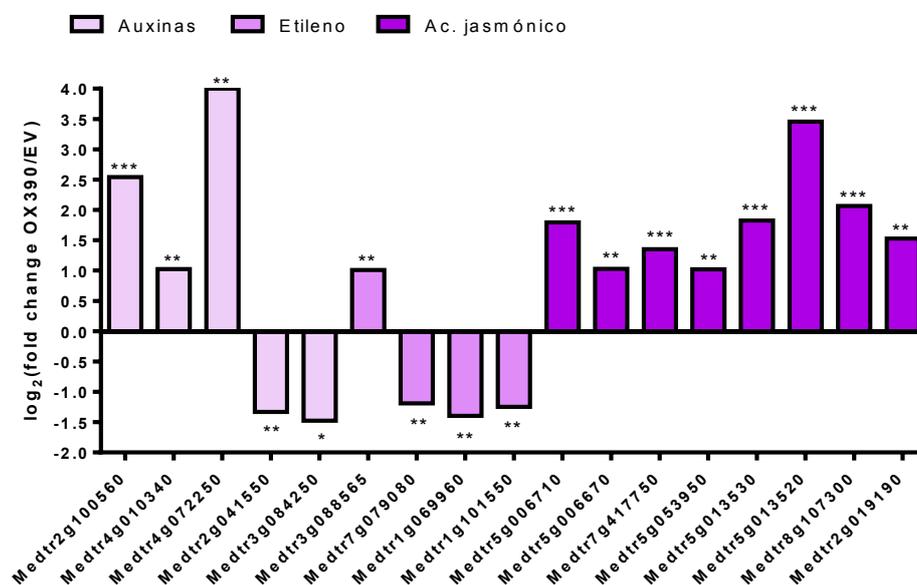


Figura 60. Cambios en los niveles de expresión de genes involucrados en el metabolismo/respuesta a auxinas, etileno y ácido jasmónico en las raíces OX390. Se muestran los valores del logaritmo en base 2 del *fold change* entre las muestras OX390 y EV inoculadas con agua (mock). Los asteriscos indican que los valores de las muestras OX390 son significativamente diferentes de las muestras EV con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

Estos resultados sugieren que la vía de miR390/TAS3 podría tener una función dual, regulando positivamente la expresión transcripcional de ciertos *targets* involucrados en la síntesis y respuesta hormonal y reprimiendo la expresión de otros. Recientemente, Simonini y

colaboradores (2017) identificaron *targets* directos de ARF3 mediante la técnica de ChIP-Seq, y combinando los datos obtenidos con RNA-seq demostraron que ARF3 es capaz de regular grupos de *targets* positiva o negativamente. Adicionalmente, han reportado que ARF3 regula genes involucrados en la repuesta hormonal, predominantemente auxinas, etileno, ácido jasmónico y citoquininas (Simonini et al., 2017). Con el fin de determinar si los GEDs pertenecientes a la categoría “metabolismo y respuesta hormonal” podrían ser *targets* putativos de ARF2, ARF3 y/o ARF4 se verificó si contienen los elementos regulatorios ARE en sus promotores. Se verificó manualmente que los 2.000 nts *upstream* al codón de inicio de la traducción, seleccionados como promotor, no se solapan con genes vecinos y, para los casos en que esto ocurría, se redujo la zona del promotor. Se encontraron entre uno y siete sitios AREs en los promotores de estos genes (Tabla S. 9). Estos resultados sugieren que los GEDs involucrados en el metabolismo o respuesta a las hormonas auxinas, etileno y ácido jasmónico podrían ser regulados a través del control transcripcional mediado por ARF2, ARF3 y/o ARF4 en las raíces que sobreexpresan el miR390. Sin embargo, resta validar los mismos experimentalmente (ver Discusión)

Por otro lado, se observó que las categorías funcionales “metabolismo de DNA y RNA”, “traducción y regulación transcripcional” se encontraron enriquecidos en los GEDs cuyos niveles de acumulación disminuyen en las raíces OX390 respecto de las raíces EV. El total de los GEDs pertenecientes a la categoría funcional “metabolismo de DNA y RNA” mostraron menores niveles de expresión en las raíces OX390 comparadas con las raíces control EV (Tablas S.7 y S.8. Figura 61). Dentro de este grupo se destacan genes que codifican las subunidades alfa (Medtr4g051380) y beta de la RNA polimerasa dirigida por DNA (Medtr4g051120, Medtr4g051130 y Medtr3g062770). Además, se encontraron reprimidos tres genes que codifican enzimas metiltransferasas específicas de citosinas (Medtr3g026210, Medtr3g026200 y Medtr3g026190). La familia de las enzimas metiltransferasas metilan las citosinas del DNA provocando el silenciamiento transcripcional. Llamativamente, en el silenciamiento transcripcional en plantas, intervienen siRNAs, los cuales silencian el DNA mediante enzimas metiltransferasas e involucra las DNA polimerasas específicas POL IV y POL V (Wierzbicki et al., 2008; Ben Amor et al., 2009; Wierzbicki et al., 2012). El análisis de los sitios ARE en los promotores de estos genes permitió identificar uno a cuatro sitios en los genes Medtr4g051130, Medtr3g062770, Medtr3g026210 y Medtr3g026200 sugiriendo que los mismos podrían ser *targets* putativos de los ARFs (Tabla S. 9). Dentro de los GEDs pertenecientes a la categoría funcional de traducción la mayoría codifican proteínas ribosomales. La excepción es un gen que codifica el factor de elongación alfa

(Medtr5g037350), cuyos niveles de expresión disminuyen en las raíces OX390 con respecto a las EV y posee dos sitios ARE en su promotor (Tabla S. 9).

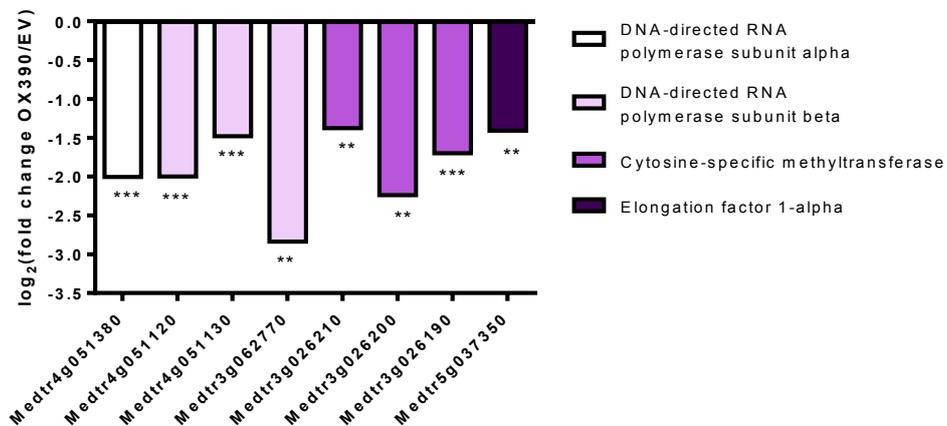


Figura 61. Niveles relativos de expresión de genes involucrados en el “metabolismo de DNA/RNA” y traducción en las raíces OX390. Se muestran los valores del logaritmo en base 2 del *fold change* entre las muestras OX390 y EV inoculadas con agua (*mock*). Los asteriscos indican que los valores de las muestras OX390 son significativamente diferentes de las muestras EV con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

Dentro de los GEDs asociados a la regulación transcripcional, el 71 % mostró menores niveles de expresión en las raíces que sobreexpresan el miR390. El análisis y clasificación de estos factores de transcripción permitió determinar que las familias *Myb* y *WRKY* fueron mayoritarias entre los DEGs regulados negativamente, mientras que los regulados positivamente pertenecen en su mayoría a la familia *bHLH* (Figura 62 A-B). Los promotores de estos factores de transcripción poseen uno o más sitios ARE, con excepción de Medtr1g087540, el cual no contiene sitios ARE (Tabla S. 9).

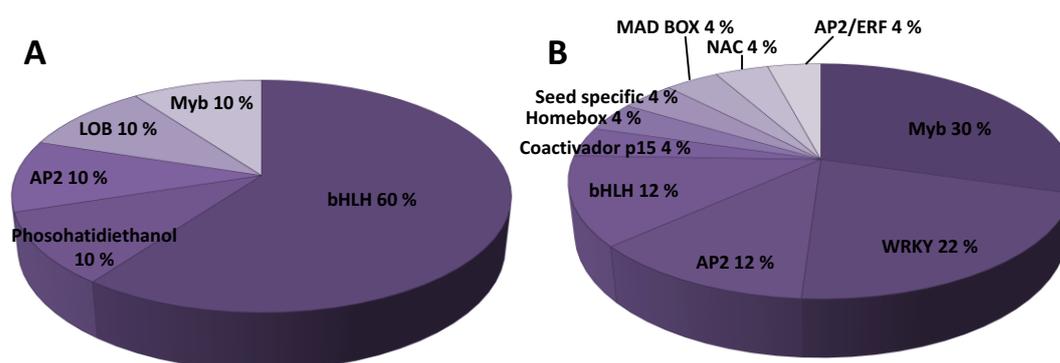


Figura 62. Clasificación de los factores de transcripción regulados diferencialmente en las raíces OX390 en diferentes familias. A-B. Se muestran gráficos de tortas representando el porcentaje de las familias de factores de transcripción cuyos niveles de expresión se encontraron aumentados (A) o disminuidos (B) en las raíces OX390 respecto a las raíces EV tratadas con agua (*mock*).

5. *Targets* putativos de la vía miR390/TAS3 en etapas tempranas de la interacción simbiótica *M. truncatula*-*S. meliloti*

Con el objetivo de identificar GEDs inducidos o reprimidos específicamente en las raíces que sobreexpresan el miR390 se realizaron diagramas de *Venn* comparando los GEDs *up*-regulados o *down*-regulados en las raíces EV y OX390 en respuesta al rizobio (Figura 63 A-B).

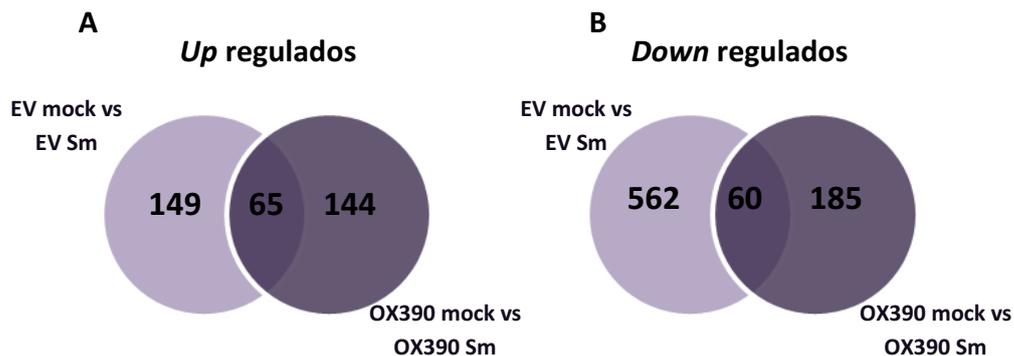


Figura 63. Superposición de los genes expresados diferencialmente entre las raíces OX390 y EV en respuesta al rizobio. Se muestran diagramas de Venn de los GEDs *up* y *down* regulados en las raíces EV (A) y OX390 (B) a las 48 horas post-inoculación con *S. meliloti* 1021.

Se observó un bajo porcentaje de solapamiento entre los genes *up* y *down* regulados (18 % y 6,20 %, respectivamente) a las 48 hpi entre las raíces OX390 y EV. Dentro de los 65 genes *up* regulados en ambas raíces transgénicas se incluyeron los marcadores moleculares de la nodulación *NIN*, *PMI*, *NF-YA1*, *ARP* y *ATT*, así como también dos factores de transcripción de la familia *Myb* y dos proteínas CKX (*cytokinin oxidase/dehydrogenase-like protein*), CKX2 y CKX3, descritas previamente (Ariel et al., 2012. Tabla S. 7). Estas CKXs se inducen en raíces de *M. truncatula* WT en respuesta al rizobio, y dicha inducción depende del receptor de citoquininas CRE1, ya que se ha reportado que en mutantes de pérdida de función del gen *CRE1* no se observa inducción de estos transcritos frente al rizobio (Van Zeijl et al., 2015). Entre los 60 GEDs compartidos entre OX390 y EV *down* regulados en respuesta al rizobio se encuentran genes involucrados en la señalización de ácido jasmónico (JAS), factores de transcripción con dominios *AP2*, *AP2/ERF1*, GRAS y de las familias *bHLH* y *Myb* (Tabla S. 8). Varios de estos genes han sido identificados en estudios previos como reprimidos en respuesta al rizobio (Traubenik et al., manuscrito en revisión). Por otro lado, se identificaron 149 GEDs inducidos específicamente en las raíces control EV y que no aumentaron sus niveles de acumulación de transcritos en las raíces OX390, dentro de los cuales se incluyen los marcadores de nodulación *EXP B1*, *RIP*, *ERN1*, *NSP2*, *ENOD11*, Medtr4g088510 y Medtr7g0742220. Estos genes no se encontraron inducidos significativamente en las raíces

OX390 frente a la inoculación con el rizobio. En el caso de NSP1 y NSP2 este resultado es consistente con lo reportado en el Capítulo I de esta Tesis. Por otra parte, 144 GEDs exhibieron una inducción específica en las raíces OX390, mientras que 562 y 185 GEDs se encontraron específicamente reprimidos en respuesta al rizobio en las raíces EV y OX390, respectivamente (Figura 63 A-B. Tablas S. 7 y S. 8). La clasificación funcional de los GEDs *up* y *down* regulados específicamente en las raíces OX390 o EV frente a la inoculación con *S. meliloti* reveló que las categorías de genes que codifican proteínas de función desconocida y de percepción y señalización son las más representativas para los GEDs tanto *up* como *down* regulados en las raíces control EV. A su vez la categoría transporte también estuvo enriquecida en GEDs *up*-regulados. En las raíces OX390 predominaron GEDs pertenecientes a las categorías de proteínas de función desconocida y de metabolismo entre aquellos *up* y *down* regulados en respuesta al rizobio (Figura 64 A-B. Tablas S. 7 y S. 8).

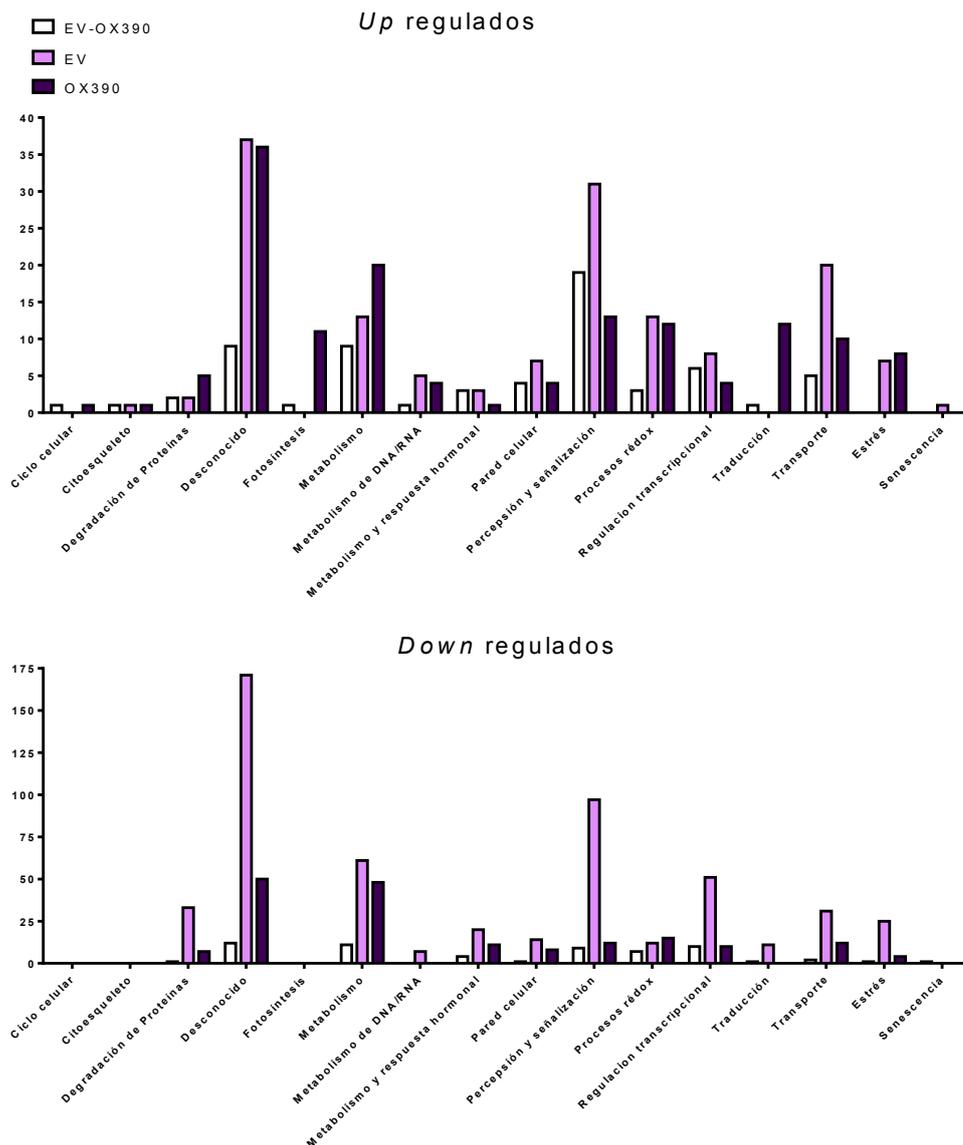


Figura 64. Clasificación funcional de los genes regulados diferencialmente en respuesta al rizobio en las raíces EV y OX390. A-B. La clasificación de los genes con expresión diferencial (GEDs) en las raíces OX390 y EV en respuesta a *S. meliloti* 1021 dentro de las diferentes categorías funcionales fue realizada en base al GO (*gen ontology*) y manualmente. Se muestran la clasificación funcional de los genes *up* (A) y *down* (B) regulados. Las barras blancas representan los DEGs regulados tanto en las raíces EV como en las OX390, mientras que las barras violeta claro representan los DEGs regulados específicamente en las raíces EV y las barras violeta oscuro los DEGs regulados específicamente en las raíces OX390.

Teniendo en cuenta que ambas raíces (OX390 y EV) son capaces de formar nódulos, este análisis sugiere que los GEDs a las 48 hpi compartidos entre las raíces control y las que sobreexpresan el miR390 serían esenciales para la organogénesis del nódulo. Por otro lado, los GEDs regulados específicamente en las raíces control y OX390 podrían regular aspectos accesorios al proceso, como por ejemplo el número de eventos de infección y/o nódulos, la morfología de los nódulos o la distribución espacial de los mismos en la raíz de la planta.

Luego se analizó el número de GEDs regulados hetero-direccionalmente frente a la inoculación con el rizobio entre las raíces OX390 y EV, es decir aquellos que aumentan en las raíces EV y disminuyen en las OX390 en respuesta al rizobio y viceversa. Este análisis permitió identificar tres genes *up* regulados en las raíces EV/*down* regulados en las raíces OX390 y 27 *down* regulados en las raíces EV/*up* regulados en las raíces OX390 en respuesta al rizobio (Figura 65 A-B).

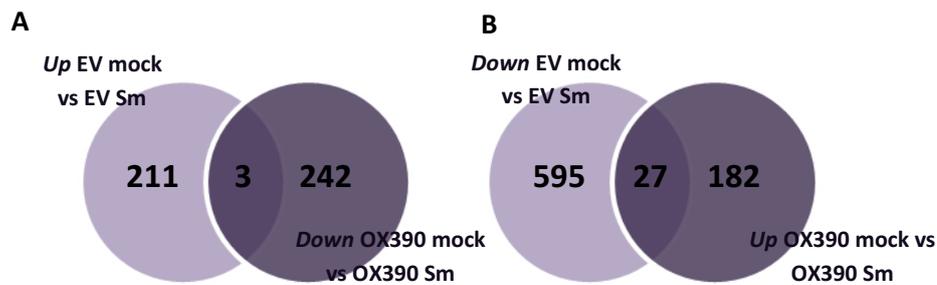


Figura 65. Superposición de los genes expresados diferencialmente entre las raíces OX390 y EV en respuesta al rizobio. Se muestran diagramas de Venn de los GEDs hetero-direccionalmente regulados, *up* y *down* regulados en las raíces EV y OX390 frente al rizobio, respectivamente (A) y viceversa (B).

Los tres genes *up* regulados en las raíces EV y *down* regulados en las raíces OX390 son Medtr7g068550, el cual codifica una proteína *GDSL-like lipase/acylhydrolase*, Medtr1g070205 que codifica un factor de transcripción de la familia LOB (*lateral organ boundaries*) y Medtr5g093430 una proteína que posee el dominio de función desconocida DUF4408. Adicionalmente, otros tres factores de transcripción pertenecientes a la familia LOB, Medtr1g070220, Medtr5g080470 y Medtr7g096530, exhibieron una mayor acumulación en sus niveles de expresión en las raíces EV en respuesta al rizobio, mientras que en las raíces OX390 no se observó inducción (Figura 66 A). Los datos de RNA-seq generados por Roux y colaboradores mostraron que los niveles de expresión de los transcritos generados a partir de Medtr1g070205, Medtr1g070220 y Medtr7g096530 son menores en nódulos de 10 dpi respecto a los de las raíces sin inocular de *M. truncatula* (Figura 66 B) y que los cuatro factores de transcripción mencionados, al igual que los genes componentes de la vía miR390/TAS3 tales como *AGO7*, *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* (Capítulo I), se encuentran enriquecidos en la zona meristemática del nódulo (Figura 66 C). Esto sugiere que estos genes de la familia LOB podrían ser targets de la vía miR390/TAS3.

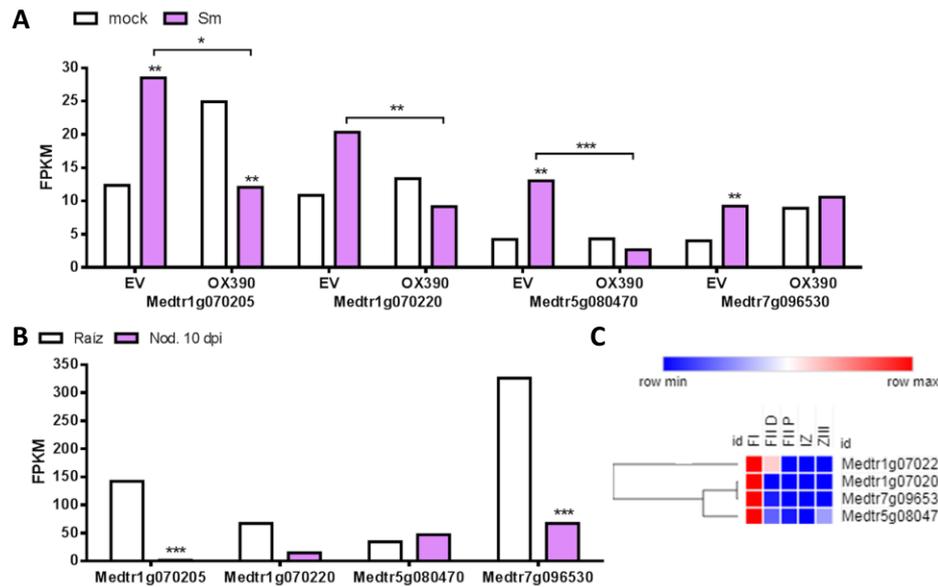


Figura 66. Niveles relativos de expresión de cuatro genes de la familia LOB. **A.** Valores FPKM de las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (*mock*, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas). **B.** Niveles de expresión en raíces y nódulos de 10 dpi y **C.** Niveles de expresión en las diferentes zonas de los nódulos de 15 dpi obtenidos de los datos de RNA-seq. Los datos presentados en **B** y **C** fueron obtenidos de los datos de Roux et al., (2014). **FI:** zona meristemática, **FIID:** zona de infección distal, **FIIP:** zona de infección proximal, **IZ:** zona intermedia y **ZIII:** zona de infección. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes de las muestras con $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

El nivel de expresión de uno de los factores de transcripción LOB (Medtr1g070205) se evaluó mediante RT-qPCR en una réplica biológica independiente de las usadas para construir las bibliotecas para verificar los datos obtenidos. Las raíces control EV, en consistencia con los resultados de las bibliotecas, mostraron una inducción de Medtr1g070205 a las 48 hpi con *S. meliloti*. Sin embargo, en las raíces OX390 los niveles de expresión de Medtr1g070205 no presentaron diferencias entre las condiciones en ausencia y presencia del rizobio (Figura 67 A). Teniendo en cuenta el fenotipo de las plantas de *M. truncatula ago7* (Zhou et al., 2013 y Capítulo 1 de esta Tesis) y que en *A. thaliana* algunos LOB regulan el desarrollo y morfología de órganos laterales tanto en parte aérea como en raíz (Semiarti et al., 2001; Okushima et al., 2005; Okushima et al., 2007; Lee et al., 2009), se analizó si la expresión del gen Medtr1g070205 se encontraba alterada en las raíces *ago7* inoculadas con *S. meliloti* luego de 48 horas. Tanto en las raíces WT como en las raíces *ago7-3* se observaron mayores niveles de acumulación de Medtr1g070205 en respuesta al rizobio. A su vez, las raíces *ago7-3* mostraron una mayor inducción más de tres veces de Medtr1g070205 en respuesta al rizobio, mientras que en las raíces WT esta inducción fue sólo de aproximadamente 1.8 veces (Figura 67 B). Estos resultados sustentan la hipótesis de que el gen de la familia LOB Medtr1g070205 sería un *target* de la vía miR390/TAS3, dado que la activación de la vía suprime su inducción en

respuesta al rizobio, mientras que la inactivación de las misma por una mutación en el gen *AGO7* da cuenta de una mayor inducción.

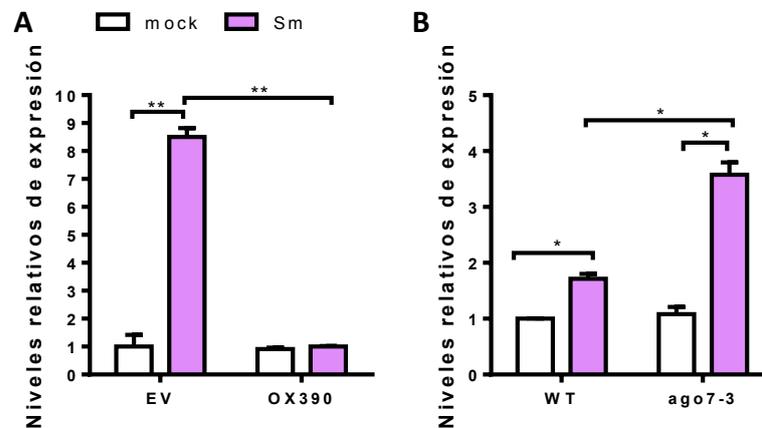


Figura 67. La vía de miR390/TAS3 regula negativamente la acumulación del transcripto Medtr1g070205 en respuesta a *S. meliloti*. A. Los niveles de expresión de Medtr1g070205 fueron cuantificados en las raíces transformadas con el vector vacío (EV) o en las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b (OX390) y B. en las raíces WT o mutantes en el gen *AGO7* (*ago7-3*) inoculadas con agua (*mock*) o con *S. meliloti* 1021 (Sm) a las 48 horas post-inoculación (hpi). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar. Los niveles de los transcriptos fueron normalizados por los niveles del transcripto *HIS3L*. Los datos están expresados relativos a la condición control EV o WT mock. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un *test t-Student* no apareado de dos colas con $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**). Los datos en B son representativos de dos replicas biológicas independientes.

La inspección de los promotores de los genes LOB permitió identificar dos sitios ARE en Medtr1g070205, Medtr1g070220 y Medtr5g080470, y seis sitios para Medtr7g096530 (Tabla S. 9). Estos resultados sugieren que la vía de miR390/TAS3 podría regular la expresión de los genes LDB1, LDB2, LDB26 y LDB48 a través de ARF2, ARF3 y ARF4 en las raíces de *M. truncatula* en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.

Por otra parte se identificaron trece genes con dominio AP2/ERF cuya expresión se reprime en las raíces EV en respuesta al rizobio a las 48 hpi, mientras que en las raíces OX390 no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión de estos genes (Figura 68 A). Incluso, los niveles de expresión de algunos de estos genes se encontraron aumentados en las raíces OX390 inoculadas con el rizobio en comparación con las raíces EV también en la condición simbiótica. El análisis de la data de RNA-seq de Roux y colaboradores demostró que los niveles de expresión de doce de los trece genes identificados fueron significativamente mayores en nódulos de 10 dpi respecto a las raíces sin inocular (Figura 68 B). A su vez, los niveles de mRNAs de diez de estos genes se encontraron enriquecidos en la región meristemática del nódulo de 15 dpi (Figura 68 C).

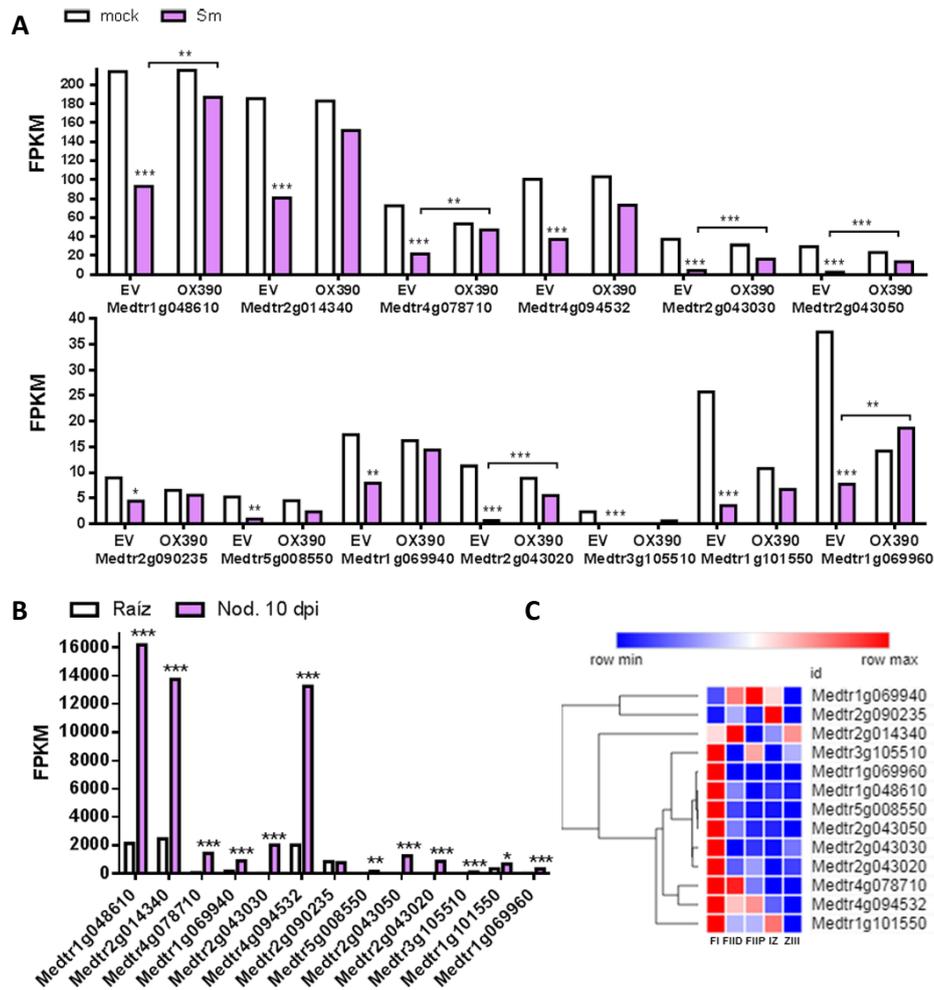


Figura 68. Niveles relativos de expresión de genes con dominio AP2/ERF. A. Valores FPKM de las muestras EV y OX390 inoculadas con agua (mock, barras blancas) y con *S. meliloti* 1021 (Sm, barras violetas). **B.** Niveles de expresión en raíces y nódulos de 10 dpi y **C. Niveles de expresión** en las diferentes zonas de los nódulos de 15 dpi. Los datos presentados en **B** y **C** fueron obtenidos de los datos de RNA-seq (Roux 2014) **FI:** zona meristemática, **FIID:** zona de infección distal, **FIIP:** zona de infección proximal, **IZ:** zona intermedia y **ZIII:** zona de infección. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes de las muestras con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

Recientemente, Shu y colaboradores (2015) identificaron 123 genes con dominios AP2/ERF en el genoma de *M. truncatula*. Estos genes fueron agrupados según un análisis filogenético en cuatro familias: *AP2*, *ERF*, *RAV* y *Soloist*. La familia *ERF* se caracteriza por poseer un único dominio AP2 y a su vez esta familia se clasifica, según sus sitios de unión al DNA, en dos subfamilias, *DREB* y *ERF*. Seis de los trece genes identificados pertenecen a la subfamilia *DREB* y tres a *ERF* (Tabla S. 9). El análisis de los elementos de unión al DNA en el promotor de estos trece genes demostró que los genes pertenecientes a la subfamilia *DREB* poseen entre uno y siete AREs, mientras que los genes de la familia *ERF* poseen uno o dos de estos elementos (Tabla S. 9). Por otro lado, cuatro genes identificados en nuestras bibliotecas con

dominios AP2/ERF no se encontraron descriptos en el trabajo de Shu y colaboradores (2015). Estos cuatro genes poseen de dos a cinco sitios ARE (Tabla S. 9).

DISCUSIÓN

6. Discusión Capítulo III

La sobreexpresión ectópica del pre-miR390b en las raíces de *M. truncatula* desencadena un cambio en la expresión génica, tanto en condiciones de ausencia como en presencia de su par simbiótico *S. meliloti*. En el Capítulo I se observó que la vía miR390/TAS3 actúa como un regulador positivo en el crecimiento de las RLs; mientras que, en la asociación simbiótica fijadora de N₂ actúa como un módulo de regulación negativo. Los *targets* directos de la vía miR390/TAS3 son los transcritos *ARF2*, *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b* (Jagadeeswaran et al., 2009; Zhou et al., 2013). Se ha propuesto que estos factores de transcripción actúan como represores de la transcripción de los genes primarios en respuesta a auxinas (Tiwari et al., 2003); sin embargo, tal afirmación no cuenta con evidencia experimental robusta que la respalde. Actualmente se desconoce el mecanismo de acción de estos ARFs. El análisis transcriptómico de las raíces OX390 sugiere que la vía miR390/TAS3 reprime más eficientemente algunas variantes particulares de los transcritos de *ARF3*, *ARF4a* y *ARF4b*. Los transcritos de *ARF3*, *ARF4a* y siete de los diez transcritos de *ARF4b* detectados en las bibliotecas, codifican proteínas que carecen del dominio de unión a las proteínas AUX/IAA, lo cual indicaría que estos factores de transcripción no se encuentran bajo la regulación de la vía canónica de auxinas. Por otro lado, los transcritos detectados de *ARF2* contienen el dominio AUX/IAA. Recientemente se ha reportado un mecanismo alternativo a través del cual la proteína IAA regula la actividad de ARF3 durante la organogénesis del gineceo en *Arabidopsis*. En este mecanismo, IAA actúa directamente sobre ARF3, sin la participación de ubiquitinación y degradación, lo cual genera la ventaja de la reversibilidad del efecto represivo de IAA (Simonini et al., 2017). En los procesos de desarrollo, por ejemplo en la formación de nuevos órganos, esta característica reversible puede ser particularmente importante y proveer la flexibilidad necesaria para adaptar el desarrollo de dichos órganos a las condiciones del medio circundante.

En ausencia del rizobio, la sobreexpresión de miR390 desencadenó un cambio en los niveles de expresión del 2,2 % (517/23.613) de los genes totales expresados. Consistentemente con el incremento de la sensibilidad y/o respuesta a auxinas y la mayor

longitud de las RLs observadas en las plantas compuestas OX390 se identificaron tres genes de respuesta a auxinas que aumentan sus niveles de expresión en las raíces OX390 respecto al control. Entre ellos una proteína *IAA-amino acid hydrolase ILR1-like protein*, la cual hidroliza IAA conjugadas a aminoácidos produciendo la liberación de IAA. En *A. thaliana* se ha reportado que miembros de esta familia regulan el crecimiento de las raíces (Rampey et al., 2004; Sanchez Carranza et al., 2016). A su vez, el promotor de esta proteína contiene tres sitios ARE, por lo cual podría estar sujeta a la regulación de los ARFs. Además, se encontraron genes con niveles de expresión afectados en consecuencia a la sobreexpresión de miR390 con sitios ARE en sus promotores, asociados a la señalización y respuesta a las hormonas etileno y ácido jasmónico. Esto sugiere que la vía de miR390/TAS3 podría tener una función dual, regulando positivamente la expresión transcripcional de ciertos *targets* y reprimiendo la expresión de otros. Consistentemente, ARF3 es capaz de regular grupos de *targets* de manera positiva o negativa en *Arabidopsis* y también se ha reportado que regula genes involucrados en la repuesta hormonal, predominantemente auxinas, etileno, ácido jasmónico y citoquininas (Simonini et al., 2017). En consecuencia es posible especular que ARF2, ARF3 y ARF4 podrían actuar como activadores o represores transcripcionales dependiendo del contexto genómico y/o su interacción con otros factores de transcripción que se asocian a regiones cercanas dentro de los mismos promotores.

En las raíces de *M. truncatula* a las 48 horas post-inoculación con *S. meliloti* se desencadenan las respuestas moleculares necesarias para la infección bacteriana y la organogénesis del primordio del nódulo (Reynoso et al., 2013). En este capítulo demostramos que la sobreexpresión de miR390 afecta la reprogramación génica en respuesta a rizobios. Sin embargo, esta reprogramación se encuentra afectada en menor medida en comparación con la respuesta transcripcional de las raíces control (EV). Llamativamente, las raíces OX390 mostraron un menor número de genes regulados negativamente en respuesta al rizobio comparado con el control. Teniendo en cuenta que miR390 regula negativamente los eventos de infección y la formación de nódulos resulta de especial interés la desregulación en los niveles de expresión de los genes con dominio AP2/ERF en las raíces OX390. Miembros de esta familia son factores de transcripción de respuesta al etileno. En leguminosas, el etileno está considerado como un regulador negativo de la nodulación, ya que la aplicación del precursor de la biosíntesis del etileno ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (ACC) inhibe la inducción del *calcium spiking* y la formación del nódulo (Oldroyd et al., 2001). Se ha reportado que el tratamiento de plantas de arvejas con etileno reprime la organogénesis del nódulo y los ITs (Lee and Larue, 1992). Adicionalmente, la mutante *sickle* de *M. truncatula* presenta un fenotipo de sobreproducción de nódulos e hiper-infección rizobiana producido por una

mutación en el gen *EIN2* (*Ethylene insensitive 2*), el cual codifica un componente de la señalización mediada por etileno, (Penmetza and Cook, 1997; Varma Penmetza et al., 2008). El efecto de *sickle* sobre la nodulación mostró estar relacionado con la inhibición del transporte de auxinas desencadenado por la inoculación con rizobios (Prayitno et al., 2006). Por otro lado, se ha reportado que concentraciones de ACC mayores de 10^{-7} M estimula la formación de RLs en *M. truncatula*, mientras que dosis más altas generan un efecto inhibitorio en la formación de RLs (Bensmihen, 2015). Sin embargo, el efecto del etileno sobre las RLs depende tanto de la concentración como de la especie vegetal (Negi et al., 2008). Trece genes AP2/ERF se encontraron reprimidos en respuesta al rizobio en las raíces control, mientras que en las raíces OX390 no se observó una disminución frente al rizobio. Si bien se necesita validar experimentalmente que el fenotipo observado en las raíces OX390 esté relacionado con la desregulación de genes de respuesta al etileno, estos resultados sugieren que las raíces que sobreexpresan el pre-miR390b carecen de la regulación negativa necesaria de algunos genes para controlar el correcto número de eventos de infección y de nódulos. Teniendo en cuenta que las proteínas ARF2, ARF3 y ARF4 podrían actuar como represores transcripcionales de sus genes *targets* (Tiwari et al., 2003), se podría especular que al sobreexpresar miR390, lo que se traduce en menores niveles de los transcriptos *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, se estaría perdiendo la represión sobre los *targets* AP2/ERF que es requerida para la correcta regulación del número de nódulos y eventos de infección. Cabe destacar que, en las raíces WT se requiere la liberación de la represión de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* por la vía miR390/*TAS3* a las 48 hpi con el rizobio para que ocurran los eventos morfológicos y organogénicos asociados a la simbiosis.

Dentro de los GEDs *down* regulados como consecuencia de la sobreexpresión de miR390 se identificaron genes asociados a la señalización y respuesta a auxinas y etileno, y miembros de la familia LOB. Los factores de transcripción LOB han sido ampliamente estudiados en *Arabidopsis* y están relacionados con el desarrollo de órganos laterales, tanto en parte aérea como en raíz (Semiarti et al., 2001; Shuai et al., 2002; Okushima et al., 2007). Estudios previos mostraron que los genes LOB exhiben un patrón de expresión temporal y específico de tejido (Shuai et al., 2002). Por ejemplo, LBD16 y LBD29 son regulados directamente por ARF7 y ARF19 durante etapas específicas del desarrollo de las RLs de *Arabidopsis* (Okushima et al., 2007). A su vez, la sobreexpresión de LBD16 y LBD29 incrementa la formación de RLs, mientras que la represión de LBD16 inhibe la formación de RLs (Okushima et al., 2007). Otro factor de transcripción LOB, AT5G63090, se expresa en la cara adaxial de la base de los primordios de órganos laterales aéreos y la expresión ectópica de este transcripto resulta en alteraciones en el tamaño y forma de hojas y flores, causando esterilidad (Shuai et al., 2002). A su vez, algunos miembros de la familia LOB están involucrados en la señalización

mediada por citoquininas y giberelinas (Zentella et al., 2007; Naito et al., 2014). La mutación de pérdida de función del gen *AS2* (*Asymmetric leaves2*), el cual codifica para una proteína con dominio LOB, resulta en la formación de hojas asimétricas lobuladas, curvas hacia abajo y anomalías en la formación del sistema vascular (Semiarti et al., 2001). Este fenotipo es similar al observado en la parte aérea similar a las mutantes del gen *AGO7* en *M. truncatula* (Zhou et al., 2013). En las plantas leguminosas los genes LOB no han sido estudiados profundamente, sin embargo un estudio de identificación y clasificación de la familia LOB en *M. truncatula* y *L. japonicus* (Yang et al., 2016) permitió determinar que los genes Medtr1g070205, Medtr1g070220, Medtr5g080470 y Medtr7g096530, denominados por Yang y colaboradores como *LBD1*, *LBD2*, *LBD26* y *LBD48*, respectivamente, pertenecen al grupo Clase I. La función de estos genes es desconocida, no obstante dentro de la Clase I se incluyen miembros de la familia de *Arabidopsis* relacionados con el desarrollo de RLs, hojas y flores, y con la cascada de señalización mediada por auxinas (Yang et al., 2016). El análisis de los datos de Roux y colaboradores demostró que los genes LOB *down* regulados por el rizobio se encuentran enriquecidos en la zona meristemática del nódulo. Por lo tanto, considerando el fenotipo multilobulado de los nódulos *ago7* es probable que la regulación directa o indirecta de la vía miR390/*TAS3* sobre estos genes sea necesaria para el mantenimiento de los meristemas en los nódulos de *M. truncatula*. En este capítulo validamos la inducción de un transcripto perteneciente a la familia LOB, Medtr1g070205, en las raíces EV y WT en etapas tempranas de la interacción simbiótica. Dicha inducción se encuentra reprimida en las raíces OX390 pero aumentada en las raíces de la mutante *ago7*. Este resultado abre una perspectiva interesante para el estudio de los genes LOB en el desarrollo y morfología de los nódulos indeterminados.

En resumen, en este capítulo encontramos genes diferencialmente regulados como consecuencia de la sobreexpresión del pre-miR390b en las raíces de *M. truncatula* tanto en presencia como en ausencia de su par simbiótico *S. meliloti*. La diferencia de los niveles de expresión de estos genes puede ser un resultado directo de la activación de la vía miR390/*TAS3* o bien un resultado indirecto. Cabe destacar que la regulación podría ser a nivel del miR390, de los tasiARFs o a través de los factores de transcripción ARF2, ARF3 ARF4a y/o ARF4b. Experimentos de inmunopurificación de cromatina seguida de secuenciación masiva de fragmentos de DNA (ChIP-seq) nos permitirían identificar y validar targets de estos factores de transcripción. La técnica de ChIP se basa en co-inmunoprecipitar regiones de la cromatina que se encuentran asociadas a factores de transcripción (u otras proteínas) mediante el uso de anticuerpos específico dirigidos contra dichos factores de transcripción o contra epitopes específicos fusionados a los factores de transcripción, por ejemplo anticuerpos anti-FLAG conjugados a bolillas magnéticas. Para ello, en el laboratorio estamos realizando fusiones

traduccionales a cada uno de los factores de transcripción ARF2, ARF3, ARF4a y ARF4b al epítopo FLAH para luego introducir las construcciones en raíces de *M. truncatula* y realizar experimentos de CHIP-seq para cada uno de los ARFs. La comparación e integración de los datos de CHIP-seq generados nos permitirán identificar targets directos para cada uno de los ARFs y dilucidar el complejo mecanismo controlado por la vía miR390/TAS3 que media el desarrollo de RLs y nódulos en la leguminosa *M. truncatula*.

**CONCLUSIONES
GENERALES
Y PERSPECTIVAS**

En la presente tesis doctoral se caracterizó funcionalmente la vía miR390/TAS3 durante el desarrollo de los órganos laterales post-embriónicos en la raíz de la leguminosa modelo *M. truncatula*. Los resultados demuestran que la vía posee una función reguladora opuesta sobre las RLs y los nódulos fijadores de nitrógeno. Por un lado actúa como un módulo de regulación positivo en el crecimiento de las RLs mientras que en la asociación simbiótica funciona como un módulo represor. Si bien se han reportado mecanismos moleculares específicos requeridos para la infección rizobiana y la formación del nódulo de tipo indeterminado también se han reportado componentes en común entre la nodulación y el desarrollo de las RLs, principalmente aquellos mecanismos que involucran la participación de hormonas, como es el caso de las auxinas y el etileno. Por lo cual se ha propuesto que el proceso de nodulación probablemente emergió a partir de programas moleculares pre-existentes del desarrollo de la RLs (Desbrosses and Stougaard, 2011). Los resultados de esta tesis suman una evidencia más a esta hipótesis.

El sistema radical de las plantas es fundamental para el anclaje de la planta al suelo, la incorporación de agua/nutrientes y las asociaciones benéficas con el medio biótico presente en la rizosfera (micorrizas/rizobios /bacterias promotoras del crecimiento vegetal). El miR390 es un microRNA conservado y se ha demostrado que regula el crecimiento de las RLs en diferentes especies, entre ellas *A. thaliana* (Marin et al., 2010), álamo (He et al., 2018) y *M. truncatula* (Capítulo I de esta tesis), lo cual indicaría que la función de la vía de miR390/TAS3 sobre las RLs también se encuentra evolutivamente conservada. Estas evidencias plantean una perspectiva interesante en la manipulación del crecimiento de las RLs, por ejemplo al aumentar los niveles endógenos de miR390 en las raíces de plantas de interés agronómico se favorecería el crecimiento de las RLs, lo cual implica una mayor superficie para la incorporación de agua y nutrientes y/o la interacción con simbiontes (micorrizas/rizobios) o bacterias promotoras del crecimiento. En *M. truncatula* la actividad espacio/temporal de los promotores de miR390a y miR390b difieren. MIR390a estaría asociado al crecimiento de las RLs y al tejido meristemático del nódulo maduro mientras que MIR390b demostró actividad en etapas tempranas y también tardías de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno. El estudio de los elementos regulatorios en los promotores de los precursores de miR390a y miR390b podría determinar qué factores inducen la expresión de los genes precursores y así manipularlos individualmente para activar y/o reprimir su transcripción y obtener plantas con raíces de mayor superficie y/o con mayor número de nódulos fijadores de nitrógeno. Por otro lado, observamos una correlación entre el aumento en los niveles de acumulación de miR390 en las raíces de *M. truncatula* y un incremento en la sensibilidad a auxinas, el aumento en la señalización y/o respuesta a auxinas y niveles de expresión alterados de genes involucrados en

el metabolismo o señalización de auxinas, etileno y ácido jasmónico (Capítulo I y III). Estas hormonas han sido involucradas tanto en el desarrollo de RLs como en la formación de nódulos. Como se mencionó en la introducción las auxinas regulan positivamente la formación de RLs y dependiendo de la concentración pueden inhibir o aumentar la nodulación (Bensmihen, 2015). Por otro lado, en las plantas leguminosas el etileno y el ácido jasmónico poseen funciones opuestas durante el desarrollo de las RLs y nódulos, regulando positivamente la formación de RLs y negativamente la nodulación (Bensmihen, 2015). Futuros ensayos de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva de fragmentos de DNA (ChIP-seq) o de PCR (ChIP-PCR) nos permitirán validar o descartar aquellos genes identificados como posibles *targets* de los factores de transcripción ARF2, ARF3 y ARF4. Los resultados de este trabajo sumado a los reportados a partir del análisis de los cambios transcripcionales en los pelos radicales en respuesta al rizobio (Breakspear et al., 2014) evidencian la importancia de la señalización y/o respuesta a auxinas en el proceso de infección rizobiana. En el capítulo I hemos demostrado que en etapas tempranas de la asociación simbiótica (48 hpi) se requiere la acumulación de los transcritos en respuesta a auxinas *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, por lo cual la represión post-transcripcional mediada por los tasiARFs sobre estos ARFs se libera como consecuencia de la inhibición la vía *miR390/TAS3*. La inhibición de la vía probablemente se lleve a cabo mediante la disminución de los niveles totales de *miR390* (Capítulo I) como así también mediante la función de *target mimicry* de la isoforma *AL TAS3* (Capítulo II), la cual capturaría al *miR390* impidiendo su acción sobre la isoforma *TAS3* y por lo tanto, la producción de tasiARFs. Futuros ensayos sobre las raíces que acumulan el transcripto *AL TAS3* contribuirían a esclarecer el mecanismo de acción de esta nueva isoforma sobre la vía *miR390/TAS3*. Además los resultados del capítulo II suman nuevas evidencias a las reportadas recientemente por Bazin y colaboradores (2017), Hou y colaboradores (2016) y Yu y colaboradores (2016) sobre la unión de *TAS3* a los ribosomas para su estabilización y producción de tasiARFs. En correlación con el fenotipo de un menor número de nódulos y eventos de infección en las raíces que sobre-acumulan el *miR390* hemos encontrado mayores niveles de acumulación de transcritos con dominios AP2/ERF frente a la inoculación con el rizobio en las raíces OX390 respecto a las raíces control. Dentro de estos transcritos se incluyen miembros involucrados en la señalización del etileno, una hormona que funciona como un regulador negativo de la nodulación (Oldroyd et al., 2001). Como perspectiva resta por validar por RT-qPCR estos resultados y mediante la utilización de mutantes, por ejemplo transformando raíces de la mutante *sickle* con la construcción OX390, nos ayudaría a establecer posicionar la vía *miR390/TAS3* respecto de la vía de señalización del etileno. Por otro lado, encontramos que la sobreexpresión de *miR390* inhibe la inducción desencadenada

por el rizobio de dos factores de transcripción requeridos durante el proceso de nodulación, *NSP1* y *NSP2* y también de los transcritos de la familia LOB. Mediante RT-qPCR hemos verificado que los niveles de acumulación de *NSP1*, *NSP2* y un transcrito LOB (Medtr1g070205) se encuentran afectados tanto en las plantas con la vía de miR390/*TAS3* activada (OX390) o inactivada (MIM390, *ago7*). Futuros ensayos de ChIP-seq o ChIP-PCR nos permitirán validar o descartar a estos genes como *targets* directos de los factores de transcripción ARF2, ARF3 y ARF4. En *A. thaliana* miembros de la familia LOB regulan el desarrollo y morfología de órganos laterales aéreos y radicales. La mutación del gen *AtAS2* (Semiarti et al., 2001) posee un fenotipo aéreo similar a las mutantes del gen *AGO7* en *M. truncatula* (Zhou et al., 2014), lo cual abre una perspectiva interesante en el estudio de estos genes y su posible relación con la morfología alterada de los nódulos *ago7*.

En conclusión los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han permitido avanzar en el conocimiento de la regulación post-transcripcional durante dos procesos de desarrollo con relevancia agronómica y ecológica. Este conocimiento podría ser trasladado en etapas futuras a la optimización de incorporación de nutrientes y nitrógeno a otras plantas cultivadas, contribuyendo a mejorar y aumentar el rendimiento de los cultivos de interés agronómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Medicago truncatula* Jemalong A17 obtenidas del *Institut National de la Recherche Agronomique* INRA, Montpellier, Francia. Las líneas mutantes *M. truncatula* por inserción con transposones *tnt-1* en el gen *ARGONAUTA7*, *ago7-1*, *ago7-2* y *ago7-3*, fueron descritas previamente por Zhou et al., (2013) y obtenidas de *The Samuel Robert Noble Foundations*. Las semillas transgénicas estables *M. truncatula* DR5:RFP, reporteras de auxinas (expresan la proteína roja fluorescente bajo el promotor DR5), fueron cedidas gentilmente por el Pascal Ratet y Jean Malo Couzigou. Las mutantes en los genes *Nodulation Signaling Pathway (NSP)1* y *2*, *nsp1* y *nsp2-1*, fueron descritas por (Smit et al., 2005) y cedidas gentilmente a nuestro laboratorio. Los experimentos realizados con las plantas mutantes *nf-ya1* y *nfp* fueron realizados en el laboratorio del Dr. Andreas Niebel (Toulouse, Francia) en marco de una colaboración internacional.

1.2. Cepas bacterianas

Para la transformación de raíces de *M. truncatula* se utilizó la cepa *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 (Quandt et al., 1993) gentilmente cedida por el VIB (*Vlaams Instituut voor Biotechnologie*), *University of Ghent*, Bélgica. Para los ensayos de inoculación de las raíces se utilizó la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* (Meade and Signer, 1977) y la cepa 1021 de *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente RFP (Lévy et al., 2004). Las cepas DH5 α y TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de *Escherichia coli* fueron utilizadas para la transformación de vectores plasmídicos.

2. Vectores de clonado

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

-pK7WG2D,1. Vector compatible con el sistema *GATEWAY* para la sobreexpresión de secuencias en plantas bajo el promotor del virus del mosaico de coliflor CaMV 35S (Karimi et al., 2002). El plásmido posee el gen Sm/SpR que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen KanR, bajo el promotor nos (nopalina sintasa), para su selección

en plantas. Además el vector posee el gen de la proteína verde fluorescente GFP como marcador reportero que permite visualizar y seleccionar las raíces transgénicas mediante microscopia de fluorescencia.

-pKGFWS7,0. Vector compatible con el sistema *GATEWAY* para la fusión transcripcional de promotores al gen reportero que codifica la proteína β -glucuronidasa (GUS) y al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (Karimi et al., 2002). El plásmido posee el gen Sm/SpR que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen KanR, bajo el promotor nos (nopalina sintasa), para su selección en plantas.

3. Medios de cultivo

-Medio LB (Luria-Bertani)

Para el crecimiento de las cepas *E. coli* DH5, TOP10 y *A. rhizogenes* Arqua I se utilizó el medio LB, el cual consiste en 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl a un pH final de 7,2. En los casos en que se utilizó medio sólido se adicionó 15 g/l de agar.

-Medio TY

Para el crecimiento de las cepas de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* RFP se utilizó el medio TY, el cual consiste en 5g/l de triptona, 3 g/l de extracto de levadura y 0,6 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En los casos que se utilizó medio sólido se adicionó 15 g/l de agar.

-Medio Fahraeus

Para el crecimiento de *M. truncatula* se utilizó el medio Fahraeus (FÅHRAEUS, 1957), el cual consiste en 114 mg/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 120 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/l de citrato férrico, 100 mg/l de KH_2PO_4 , 150 mg/l de Na_2HPO_4 y los microelementos 3,73 mg/l de KCl, 1,55 mg/l de H_3BO_3 , 0,85 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,13 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,58 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En los casos que se utilizó medio Fahraeus suplementado con NO_3^- se adicionó 8 mM de KNO_3 . En los casos que se utilizó medio sólido se agregó 10 g/l de agar.

-Medio de preservación de microorganismos

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron luego suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 % (v/v). Las suspensiones de bacterias fueron congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y preservadas a esa temperatura.

-Antibióticos

Se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos en medios de cultivos sólidos o líquidos:

Antibiótico	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>A. rhizogenes</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. meliloti</i> 1021 ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. meliloti</i> RFP ($\mu\text{g/ml}$)	<i>M. truncatula</i> (mg/l)
Kanamicina	50	-	-	-	12,5
Espectinomicina	50	200	-	-	-
Estreptomicina	-	-	200	200	-
Tetraciclina	-	-	-	5	-

4. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico

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

Las reacciones para la amplificación de fragmentos de DNA se llevaron a cabo en un ciclador térmico *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 μl . La concentración final en la mezcla de reacción fue: 0.25 μM de cada *primers*, 0.20 mM de desoxiribonucleótidos (dNTPs) y 1,5 mM de MgSO_4 . Se utilizó el *buffer* comercial para la enzima polimerasa *Taq pegasus* y 1 U de la enzima (PB-L Productos Bio-Lógicos). Como moldes se utilizaron células, plásmidos, gDNA o cDNA, dependiendo del caso. El ciclado incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de un número de ciclos de desnaturalización, *annealing* y elongación, y una etapa final de elongación. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación exceptuando los casos de amplificación semicuantitativa, en los cuales se utilizó 25 ciclos, y en algunos casos de amplificación de promotores, en los cuales se utilizó 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo se inició con 30 segundos a 95°C. La temperatura de *annealing* se eligió 5°C por debajo de la temperatura de *melting* de los *primers* utilizados (Tabla..). El ciclo se completó con una incubación a 72°C durante 1 minuto por cada kpb a amplificar. Finalizados los ciclos, se mantuvo a 72°C durante 5 minutos para la etapa de elongación final.

Para la amplificación de fragmentos utilizados en los clonados se utilizó la enzima polimerasa *Pfu* (PB-L Productos Bio-Lógicos). Esta enzima posee actividad exonucleasa 3' a 5', lo cual permite la corrección de errores en la amplificación (*proofreading*) y carece de la actividad transferasa terminal. Se utilizaron las condiciones indicados por el proveedor de la enzima.

4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de amplificación de PCR y las muestras de DNA plasmídicos fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 0,5 % y 2,8 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en *buffer* TBE 0,5 X (Tris Base 0,045 M; H₃BO₃ 0,045 M; EDTA 0,5 mM) y se adicionó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. A las muestras para sembrar se les agregó 1/6 volúmenes de *buffer* 6 X de siembra para DNA (*buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0; glicerol 50 % (p/v); azul de bromofenol 0,5 % (p/v); EDTA 2 mM Ph 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5 X a voltaje constante, usando 10 V por cada cm lineal de gel. Para visualizar y registrar las corridas electroforéticas se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta y una cámara digital (UVITEC Cambridge).

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

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

4.4. Clonados de fragmentos de PCR en el vector *pENTR/D-TOPO*

El *kit* de clonación *pENTR/D-TOPO* (Invitrogen) permite la incorporación direccional de un fragmento de PCR en un plásmido compatible con el sistema *GATEWAY*. El método de clonación de este vector se basa en una ligación direccional mediante la enzima topoisomerasa I en uno de los extremos del plásmido. Se realizó una amplificación con *primers* para la secuencia de interés que contiene los nucleótidos CACC adicionales en el extremo 5' del *primer forward*. Se mezcló 10-50 ng del fragmento amplificado por PCR con 0,5 µl del vector *pENTR/D-TOPO* y 0,5 µl de una dilución 1/4 de la solución salina. La mezcla de reacción se incubó durante una noche a 23°C y luego se la utilizó para transformar células electrocompetentes *E. coli* TOP10. Por último, se plaqueó en medio LB-agar conteniendo kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml y se incubó a 37°C durante 24 horas.

4.5. Recombinación sitio específica mediante el sistema *GATEWAY* (LR Clonasa)

Se realizó una recombinación sitio específica entre el vector *pENTR/D-TOPO* con el fragmento adecuado y el vector de destino. El vector de destino posee las secuencias attR1 y

attR2 para permitir la recombinación con las secuencias attL1 y attL2 del *pENTR/D-TOPO*. Se mezcló 2 µl del vector *pENTR/D-TOPO* con 2 µl del vector de destino y se adicionó 1 µl de la enzima *LR Clonase enzyme mix* (Invitrogen). Se incubó a 23°C durante una la noche. Luego se agregó 1 µl de la proteinasa K para inactivar la enzima y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Se utilizó 3 µl de la mezcla de reacción obtenida para transformar células de *E. coli* DH5 competentes químicas. Por último, se plaqueó en medio LB-agar conteniendo el antibiótico adecuado según la construcción de interés y se incubó a 37°C durante 24 horas.

4.6. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de plásmidos a partir de células de *E. coli* DH5 o TOP10, transformadas con las construcciones de interés, se realizó según el método de lisis alcalina. Las células transformadas se crecieron en medio LB con el antibiótico adecuado a 37°C con agitación (150 rpm) durante una noche. Luego, se centrifugó 1,5 ml del cultivo bacteriano saturado a 4000 rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado, mediante vortex, en 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) previamente enfriada a 4°C. Seguidamente, se agregó 200 µl de la solución II (NaOH 0,2 N, 1% SDS (p/v)), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregó 150 µl de la solución III (acetato de potasio 5 M pH 4,8) previamente enfriada a 4°C e inmediatamente se mezcló por inversión. Nuevamente, se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 12000g por 5 minutos a 4°C y luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril. La extracción del plásmido se realizó mediante el uso de sílica (SiO₂). Se agregó 10 µl de una suspensión de sílica 1,3 % (p/v) para unir el DNA y se mezcló por inversión. A continuación, se precipitó la sílica mediante centrifugación a 13000g durante 10 segundos y luego se descartó el sobrenadante. Se lavó la sílica 3 veces con 500 µl de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM, etanol 50%) resuspendiendo la sílica mediante vortex y centrifugando a 13000g por 10 segundos en cada ocasión. Posteriormente, se secó la sílica 5 minutos al aire hasta eliminar los restos de etanol. Se resuspendió la sílica en 50 µl de agua bidestilada, se calentó a 60°C durante 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 13000g durante 2 minutos y se transfirió el sobrenadante, conteniendo el plásmido a un nuevo tubo estéril.

Las extracciones de DNA plasmídico para enviar a secuenciar, efectuar digestiones con enzimas de restricción y clonados se realizaron con el kit comercial Miniprep Puro Plásmido (PB-L productos Bio-logicos).

4.7. Preparación de células de *E. coli* DH5 competentes químicas

Las células de *E. coli* DH5 se cultivaron en medio LB durante una noche a 37°C con agitación (150 rpm). Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB y se incubó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,5. Luego, se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de solución I (MOPS 10 mM pH 7,0; KCl 10 mM) previamente enfriada a 4°C. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de solución II (MOPS 100 mM pH 6,5; KCl 10 mM; CaCl₂ 50 mM) previamente enfriada a 4°C. Se incubó durante 15 minutos en hielo y seguidamente se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de solución II a 4°C. Finalmente, se fraccionó en alícuotas de 100 µl agregando glicerol para llevar a concentración final 20%, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

4.8. Preparación de células de *E. coli* TOP10 electro-competentes

Las células de *E. coli* TOP10 se cultivaron en medio LB durante una noche a 37°C con agitación (150 rpm). Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB y se incubó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,5. Luego, se centrifugó 10 minutos a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 ml de glicerol 10 % previamente enfriado a 4°C. Se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 ml de glicerol 10 % a 4°C. Nuevamente, se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 4 ml de glicerol 10 % a 4°C. Se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de glicerol 10 % a 4°C. Finalmente, se fraccionó en alícuotas de 40 µl, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

4.9. Transformación de células de *E. coli* DH5 competentes químicas

Una suspensión de 100 µl de las células competentes se mezcló con 1 µl de plásmido y se incubó en hielo durante 40 minutos. Luego, se realizó un tratamiento térmico (*heat shock*) incubando la muestra a 42°C durante 1 minuto, inmediatamente se enfrió en hielo por 10 minutos. Seguidamente se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación (150

rpm) durante una hora. Por último, la mezcla de transformación se plaqueó en medio LB-agar con el antibiótico adecuado para la selección y la placa se incubó a 37°C durante 24 horas.

4.10. Transformación de células de *E. coli* TOP10 electro-competentes

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

4.11. Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción

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

5. Construcción de plásmidos

5.1. Construcción de los plásmidos para el análisis espacio temporal de los promotores de los genes de la vía del miR390/TAS3

Se diseñaron *primers* para amplificar las secuencias 1568 y 1493 pb *upstream* de los precursores de miR390a y miR390b, respectivamente, y *primers* para las secuencias 1980, 1958 y 1819 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción de los genes *TAS3*, *ARF3* y *ARF4*, respectivamente (Anexo. Tabla 6). La amplificación de los fragmentos de DNA se realizó mediante PCR utilizando como molde DNA genómico de *M. truncatula* Jemalong A17. Luego, se purificaron los fragmentos de DNA y se llevó a cabo la reacción del *pENTR/D-TOPO*. Se transformaron células electro-competentes *E. coli* TOP10. Posteriormente, se realizó la extracción del plásmido *pENTR/D-TOPO* con el fragmento de interés y seguidamente se realizó

la recombinación sitio específica entre el *pENTR/D-TOPO* y el vector de destino pKGWFS7,0, utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células competentes químicas *E. coli* DH5. Luego, se realizó la purificación del plásmido y se confirmó la identidad y orientación del fragmento de DNA mediante secuenciación.

5.2. Construcción del plásmido OX390 para la expresión ectópica del precursor del microRNA390b

Se realizó una amplificación de precursor de miR390b mediante PCR utilizando los *primers* detallados en la Tabla 6 (Anexo) y DNA genómico de *M. truncatula* Jemalong A17 como molde. El fragmento obtenido fue purificado y clonado en el vector *pENTR/D-TOPO*. Posteriormente, se realizó la recombinación sitio específica entre el *pENTR/D-TOPO* conteniendo el fragmento del precursor del miR390b y el vector de destino pK7WG2D,1, utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* DH5. Se aislaron los plásmidos recombinantes y se confirmó la identidad de la construcción por secuenciación. Cabe destacar que la construcción fue realizada en el laboratorio de Dr. Martin Crespi y cedida gentilmente a nuestro laboratorio.

5.3. Construcción del plásmido MIM390 para la expresión de un target mimicry de miR390

Se diseñaron *primers* (Anexo. Tabla 6) para amplificar por PCR la secuencia complementaria del miR390 maduro con una mutación en el sitio de clivaje de miR390 (MIM390), utilizando como molde DNA genómico de *M. truncatula* Jemalong A17. El producto de amplificación se purificó y se utilizó para reemplazar la secuencia de MIM399 en el gen *Induced by Phosphato Starvation1 (IPS1)* por la secuencia MIM390 (Franco-Zorrilla et al., 2007). Luego, se amplificó mediante PCR la secuencia de *IPS1* conteniendo la secuencia MIM390 utilizando los *primers* detallados en la Tabla 6 (Anexo), se clonó en el *pENTR/D-TOPO* y seguidamente se recombinó en el vector pK7WG2D. La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* DH5. Se aislaron los plásmidos recombinantes y se confirmó la identidad de la construcción por secuenciación. Cabe destacar que la construcción fue realizada en el laboratorio de Dr. Martin Crespi y cedida gentilmente a nuestro laboratorio.

5.4. Construcción de los plásmidos OXTAS3 y OXALTAS3 para la expresión ectópica de TAS3 y ALT TAS3

Se realizó una amplificación de los marcos abiertos de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) de los transcritos *TAS3* y *ALT TAS3* mediante PCR utilizando los *primers* detallados en la Tabla 5 (Anexo) y cDNA como molde. El fragmento obtenido fue purificado y clonado en el vector *pENTR/D-TOPO*. Posteriormente, se realizó la recombinación sitio específica entre el *pENTR/D-TOPO* conteniendo el fragmento de interés y el vector de destino *pK7WG2D,1*, utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* DH5. Se aislaron los plásmidos recombinantes y se confirmó la identidad de la construcción por secuenciación.

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

6.1. Preparación de células de *A. rhizogenes* Arqua1 electro-competentes

Las células de *A. rhizogenes* ARqua1 se cultivaron en medio LB durante una noche a 28°C con agitación (150 rpm). Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO600 de 0,6. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 6.000 xg durante 10 minutos. Una vez removido el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 ml de glicerol 10 % (v/v). Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, descartando luego el sobrenadante y resuspendiendo en 25 ml de glicerol 10 % (v/v). El mismo procedimiento se repitió reduciendo el volumen de solución de glicerol a 4 ml, llegando luego a la solución final en la que se resuspendió el producto de la centrifugación en 500 µl de glicerol 10 % (v/v). Finalmente se fraccionó en alícuotas de 40 µl, se colocaron los tubos rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

6.2. Transformación de células de *A. rhizogenes* Arqua1 mediante electroporación

Se utilizaron cubetas de electroporación de un espesor de 2 mm mantenidas a -20 °C. 1 µl de plásmido se mezclaron con 40 µl de células electrocompetentes, mantenidas en hielo. Luego, la mezcla se transfirió a la cubeta y se produjo un pulso de 1,8 kV/200Ω/25µF con un electroporador *Gene Pulser* (BioRad, Hércules, CA, USA). Inmediatamente se agregó 1 ml de LB. La mezcla se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml y se incubó con agitación a 28 °C por una

hora. Las células se plaquearon en medio LB-agar con el antibiótico adecuado y se incubaron a 28°C durante 2 días.

6.3. Escarificación, esterilización y germinación de semillas de *M. truncatula*

Las semillas de *M. truncatula* se escarificaron químicamente mediante inmersión en H₂SO₄ anhidrido 98% (v/v) y agitación hasta la aparición de pequeños puntos negros en las semillas (aproximadamente 5 por semillas). Luego, se removió cuidadosamente todo el H₂SO₄ y se realizaron cuatro lavados con agua destilada fría. La esterilización se realizó incubando las semillas en una solución de hipoclorito de sodio 12 g/l durante 2 minutos. Se realizaron seis lavados con agua destilada estéril dentro de flujo laminar. Seguidamente, se transfirieron hasta 50 semillas por cada placa de Petri conteniendo H₂O-agar 8 % (p/v). Las placas se incubaron invertidas a 4°C en oscuridad al menos 3 días para sincronizar la germinación y obtener radículas rectas. Al cabo de dicho tiempo, las semillas se transfirieron a 25°C y se incubaron por aproximadamente 30 horas. A este tiempo las radículas presentaron la longitud adecuada de aproximadamente 10 mm para transferirlas a placas o potes, o para realizar la transformación mediante *A. rhizogenes*.

6.4. Transformación de raíces de *M. truncatula* mediada por *A. rhizogenes* Arqua1

Para la generación de las raíces transgénicas se utilizó el método de transformación mediado por *A. rhizogenes* Arqua1 reportado por Chabaud y colaboradores (Chabaud et al., 2006). Se creció un cultivo de la cepa de *A. rhizogenes* conteniendo el antibiótico adecuado según la construcción de interés en medio agar-LB durante dos días a 28°C. Obtenidas las radículas *M. truncatula*, de alrededor de 10 mm (como se describió en la sección 6.3 de materiales y métodos), se seccionó 3 mm desde la punta de la radícula y el sitio de corte se inoculó con el cultivo de *A. rhizogenes* de interés. Las radículas inoculadas se colocaron en placas de petri (6 plantas por placa) con medio agar-Fahraeus suplementado con KNO₃ y kanamicina para la selección de las raíces transgénicas. Posteriormente, las plantas se incubaron en posición vertical en una cámara Sanyo con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad, durante 7 días a 20 °C. Esta temperatura aumenta significativamente la eficiencia de transformación. Pasados siete días, las plantas fueron transferidas a 25°C en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de una semana se visualizaron las raíces transgénicas y las plantas fueron transferidas a cajas cuadradas de acrílico o potes para su crecimiento y posterior ensayos.

7. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas

7.1. Crecimiento de las plantas *M. truncatula*

El crecimiento de las plantas de *M. truncatula* se realizó mediante dos sistemas: potes y placas cuadradas de acrílico, dependiendo del ensayo a realizar. Para el crecimiento en potes, una vez germinadas las semillas o generadas las plantas compuestas se transfirieron a potes conteniendo una mezcla estéril de perlita-arena en una relación 3:1, respectivamente, humedecidas con H₂O-Fahraeus o con H₂O-Fahraeus suplementado con KNO₃. Los potes fueron cubiertos con un film para mantener la humedad de las semillas durante los primeros cuatro días. Las plantas se crecieron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-350HT a 25 °C, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad. Al cabo de una semana las plantas alcanzan el tamaño adecuado para los ensayos fenotípicos o moleculares. Por otro lado, el crecimiento en placas se realizó en placas cuadradas de acrílico de 10x12x1.5 cm conteniendo agar-Fahraeus o agar-Fahraeus suplementado con KNO₃. Se colocó un papel sobre el medio para mantener la humedad y se transfirieron las semillas germinadas o las plantas compuestas, seis por placa. Se crecieron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-350HT a 25 °C, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad y luego de una semana las plantas alcanzan el tamaño adecuado para los ensayos fenotípicos o moleculares.

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

Para la inoculación de las raíces de *M. truncatula* con su par simbiótico *S. meliloti* se utilizó el protocolo reportado por Journet y colaboradores (Journet et al., 2006). Los rizobios se crecieron en medio TY conteniendo el antibiótico adecuado a 28°C y agitación (200 rpm) durante toda la noche. Posteriormente, se largó un cultivo fresco que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.6-0.8. Se utilizó 20 ml de una dilución (DO₆₀₀ de 10⁻³) del cultivo de *S. meliloti* en medio Fahraeus para inocular las raíces crecidas en potes y 10 ml de una dilución de *S. meliloti* con una concentración de 5x10⁵ bacterias/ml en agua destilada estéril para inocular las raíces crecidas en placas. Luego de la inoculación, las placas se mantuvieron en posición horizontal durante 1 hora, posteriormente se retiró el exceso de suspensión y se incubaron en posición vertical.

7.3. Inoculación de las raíces de *M. truncatula* con Nod Factors (NFs)

Se preparó una solución stock 10 mM NFs resuspendiendo los NFs purificados en 50 % (v/v) de etanol. La dilución final de 10^{-8} M NFs se preparó en H₂O bidestilada y se utilizaron 10 ml para inocular las raíces de *M. truncatula* por cada placa cuadradas de acrílico. Luego de la inoculación, las placas se mantuvieron en posición horizontal durante 1 hora, posteriormente se retiró el exceso de suspensión y se incubaron en posición vertical.

7.4. Cuantificación del número de nódulos

Se cuantifico el número de nódulos por raíz transgénica (cada evento de transformación es independiente) en las plantas compuestas crecidas en placas cuadradas de acrílico a diferentes días post-inoculación (dpi) con la cepa *S. meliloti* 1021. En las plantas mutantes estables *ago7* y en las plantas wt se cuantificó el número de nódulos por planta crecidas en potes a los 28 dpi con *S. meliloti* 1021. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 70 raíces transgénicas o 6 plantas.

7.5. Determinación del tamaño de nódulos

Para determinar el tamaño de los nódulos se capturaron imágenes utilizando una lupa LEICA MZFL III. A continuación, el largo de cada nódulo fue determinado utilizando la herramienta de medición del programa *Adobe Photoshop v. 7.0*. El número de pixeles fue convertido a mm utilizando una regla como escala. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 40 nódulos.

7.6. Determinación del peso seco de la parte aérea

Para determinar el peso seco de la parte aérea se crecieron las plantas transgénicas en potes durante 16 dpi con *S. meliloti* 1021. Se tomó el tejido aéreo correspondiente a una

planta y se envolvió en papel aluminio. Cada muestra se colocó en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante (aproximadamente por 48 horas.). El peso se determinó utilizando una balanza analítica. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 28 partes aéreas.

7.7. Cuantificación y clasificación de los eventos de infección

Para cuantificar y clasificar la progresión de los ITs se crecieron las plantas compuestas, mutantes o wt en placas cuadradas. Luego, se inocularon las raíces con la cepa *S. meliloti* RFP (Levy et al, 2004). Entre los 6-7 dpi se cuantificó el número de ITs por cm de raíz utilizando un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX51. A su vez se clasificó la progresión de los ITs según se encontraron en los pelos radiculares (pelo), elongados a través de las células epidérmicas (epidermis) o llegando a las células del córtex en división (córtex). Se determinó la densidad total de ITs según el número de ITs por cm de raíz, y la densidad según la progresión (número de ITs en pelo, epidermis o córtex por cm de raíz), así como también el porcentaje de progresión de ITs (número de ITs en pelo, epidermis o córtex por número de ITs total). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 14 raíces.

7.8. Cuantificación de la longitud de las raíces

Se crecieron las plantas compuestas, mutantes o wt en placas cuadradas conteniendo medio Fahraeus suplementado con 8 mM KNO₃. Luego de 15 días, se cuantificó manualmente la longitud de las RLs emergidas y las RPs. En adición, se calculó la densidad de RLs como el número de RLs emergidas por longitud de RP. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 20 plantas.

7.9. Sensibilidad de las raíces compuestas a auxinas

Para evaluar la sensibilidad de las raíces OX390 y EV a auxinas, se traspasaron las plantas compuestas a placas cuadradas conteniendo medio Fahraeus suplementado con 8 mM KNO_3 y con 5 μM , 10 μM o sin ácido indolacético (IAA) como control. A los 15 días se cuantificó la diferencia de la longitud de la RP crecidas en IAA con respecto a la longitud de las RP cuando se traspasaron al medio Fahraeus suplementado. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *GraphPad Prism v. 6*. Se calculó la media \pm el desvío estándar y mediante un test estadístico, t-test no apareado de dos colas, se determinó si los valores fueron estadísticamente significativos. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo con más de 10 raíces transgénicas.

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

8.1. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo a partir de hojas de *M. truncatula* Jemalong A17. El tejido se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero. El polvo se transfirió a un tubo y se añadieron 400 μl de *buffer* de extracción (EDTA 10 mM, pH 8; Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 100 mM; 2- β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 1 % p/V). Se incubó 10 min a 65 $^{\circ}\text{C}$. Luego, se adicionó 145 μl de la solución 3 (acetato de potasio 5 M pH 4,8) y se mezcló por inversión. La muestra se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se incubó con 1 μl de RNAsa 10 mg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se precipitó el DNA con 400 μl de isopropanol mediante 5 minutos de centrifugación a 13.000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$. Luego, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 800 μl de etanol 80 % V/V. Se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$, se secó el precipitado a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el DNA en 50 μl de agua estéril. El DNA obtenido se conservó a 20 $^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

8.2. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se colectaron los tejidos correspondientes, se pulverizaron con mortero y N₂ líquido y se almacenaron en un freezer a -80 °C hasta su utilización. El RNA total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo provisto por el proveedor, el cual consta de los siguientes pasos:

1) Homogeneización: se agregaron 800 µl de reactivo Trizol por cada 50-100 mg de tejido. La mezcla se agitó 15 segundos en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

2) Separación de fases: se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y luego se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos a 4 °C. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una acuosa, la cual contiene el RNA, y otra orgánica, donde se encuentran las proteínas. En la interfase permanece el DNA. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo evitando tomar interfase.

3) Precipitación de RNA total: se agregó un volumen de isopropanol igual al volumen de la fase acuosa obtenida. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12,000 g durante 8 minutos a 4 °C, obteniéndose un precipitado de color blanco.

4) Lavado de RNA total: se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 800 µl de etanol 75%. Luego, se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos a 4 °C.

5) Solubilización de RNA total: se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se resuspendió en 50 µl de agua estéril. La solución se incubó durante 10 minutos a 55 °C en un baño seco para solubilizar el RNA y se almacenó a -80 °C.

8.3. Análisis de calidad de ácidos nucleicos

Para evaluar la integridad del gDNA y RNA total obtenidos se realizó una electroforesis no desnaturante en geles de agarosa 1,2 % p/V, visualizándose en las muestras de RNA total las bandas correspondientes a rRNA y en las muestras de gDNA una banda. La concentración de las muestras de RNA total se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) medida en un espectrofotómetro nanodrop ND 2000 (Thermo Scientific) y se estimó su pureza a través de la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

9. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcripto

9.1. Digestión de gDNA en las muestras de RNA total

Se digirió 700 ng de RNA total con 1U de la enzima RQ1 DNAsa libre de RNAsa (Promega) utilizando el *buffer* suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 μ l. Se incubó durante dos horas a 37 °C y se agregó 1 μ l de la solución *stop* (EGTA 10 Nm, Promega). Se incubó durante 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

9.2. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó a partir de 700 ng de RNA total tratado con DNAsa libre de RNAsa. A cada muestra de RNA se le adicionó con 0,5 μ g de oligodT, se incubó a 70 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el RNA y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 5 μ l de buffer de reacción 5X M-MVL RT (Promega), 1,25 μ l de dNTPs 10 mM y 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Promega), llevando a un volumen final de 25 μ l con agua estéril. La síntesis de cDNA se realizó incubando durante 1 hora a 42 °C y posteriormente se inactivó la enzima incubando durante 10 minutos a 65 °C. Finalmente se ajustó el volumen a 200 μ l con agua estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

9.3. Ensayos de qPCR

Cinco μ l de los 200 μ l de la síntesis de la primera hebra de cDNA fueron utilizados como molde en una reacción de PCR cuantitativa. Se utilizó una concentración de 0,5 μ M de cada *primer* en un volumen final de 20 μ l. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad). La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real *CFX96 Real-Time System* (BioRad) con una primera etapa a 95 ° durante 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 23 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 20 segundos a 72 °C. La amplificación de un único producto fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) teñido con bromuro de etidio. También se realizaron curvas de *melting* para cada producto de reacción al finalizar la corrida.

9.4. Análisis y normalización de los datos de qPCR

Los datos del ciclo de detección umbral (Ct) fueron obtenidos como mínimo para dos réplicas técnicas para cada cuantificación. Se realizó una curva de calibración para los transcriptos utilizando diluciones seriadas del cDNA sintetizado. Se analizó la validez de los transcriptos de referencia *ACTINA11* y de *HISTONA3L* mediante GNORM (Vandesompele et al., 2002; Ariel et al., 2010). Estos transcriptos se utilizaron para la normalización de los datos según se describió previamente (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Reynoso et al., 2013). Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad v. 6.

10. Métodos para la cuantificación de sRNAs

10.1. Síntesis de cDNA mediante la técnica *stem-loop*

Para la síntesis de la primer cadena de cDNA de los miRNAs maduros y tasiARFs se utilizaron *primers stem-loop* (Varkonyi-gasic et al., 2007. Anexo Tabla 6). Se partió de 2 mg de RNA total. A cada muestra de RNA total se le adicionó 1 μ l de dNTPs 10 mM y 1 μ l de una mix de *primers stem-loop* 100 μ M en un volumen final de 13 μ l. Se incubó a 65 $^{\circ}$ C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Luego de 1 minuto en hielo, se adicionó 4 μ l del *buffer first-strand 5X* (Invitrogen), 1 μ l DTT 10 mM y 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa *SuperScript III* 200U/ μ l (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l. Se incubó durante una hora a 55 $^{\circ}$ C y posteriormente se inactivó la enzima incubando a 70 $^{\circ}$ C durante 15 minutos. Finalmente se ajustó el volumen a 100 μ l con agua estéril y se almacenó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

10.2. Ensayos de qPCR para sRNAs

Cinco μ l de los 100 μ l de la síntesis de *stem-loop* cDNA fueron utilizados como molde en una reacción de PCR cuantitativa. Se utilizó una concentración de 0,5 μ M de cada *primer* en un volumen final de 20 μ l. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad). La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real *CFX96 Real-Time System* (BioRad) con una primera etapa a 95 $^{\circ}$ durante 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 5 segundos a 95 $^{\circ}$ C, 10 segundos a 60 $^{\circ}$ C y 1 segundo a 72 $^{\circ}$ C. La amplificación de un único producto fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) teñido con bromuro de etidio. También se realizaron curvas de *melting* para cada producto de reacción al finalizar la corrida.

10.3. Análisis y normalización de los datos de qPCR

Los datos del ciclo de detección umbral (Ct) fueron obtenidos como mínimo para dos réplicas técnicas para cada cuantificación. Se realizó una curva de calibración para los transcritos utilizando diluciones seriadas del cDNA sintetizado. Se utilizó como transcripto de referencia *U6*. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad v. 6.

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

Para detectar los transcritos producidos por el *locus* de *TAS3* se llevó a cabo un ensayo 3' RACE utilizando el kit *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen). Se sintetizó la primer hebra de cDNA a partir de RNA total libre de gDNA utilizando el *primer AP (Adapter Primer, tabla ..)* siguiendo el protocolo provisto por Invitrogen. Luego, se realizó una amplificación mediante PCR utilizando el *primer TAS3 F* y el *primer UAP (Universal Amplification)* (Anexo Tabla 6). Seguidamente, se realizó un segundo paso de amplificación mediante PCR utilizando un *nested primer TAS3N F* y el *primer UAP* (Anexo Tabla 6). Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,8 % (p/V), se clonaron y se secuenciaron para confirmar su identidad.

12. Construcción, secuenciación y análisis de las bibliotecas

12.1. Material biológico y construcción de las bibliotecas

Como material biológico de partida para el RNA-seq se utilizaron raíces OX390 y EV de 48 hpi con *S. meliloti* 1021. Para cada condición se realizaron 3 réplicas biológicas con un mínimo de 30 raíces transgénicas por condición. A partir del tejido obtenido, se realizó la extracción de RNA total de cada muestra utilizando Trizol (Invitrogen). El RNA total obtenido fue analizado cuali y cuantitativamente mediante electroforesis capilar con el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Todas las muestras superaron el valor mínimo de RIN (*RNA integrity number*) sugerido por Illumina. Este parámetro estima la integridad del RNA. Para la construcción de las bibliotecas se partió de 1,5 µg de RNA y se siguió el protocolo 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 transcripto 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. Una vez obtenidas las bibliotecas se corrió en un gel de agarosa 1,6 % (p/V) para verificar la integridad y una concentración uniforme entre las bibliotecas. Luego, las bibliotecas se mandaron a IPS2, Université de París Saclay, Francia, en donde se realizó un análisis de calidad mediante una electroforesis capilar utilizando el equipo 2100 Bioanalyzer. Finalmente, las bibliotecas generadas se secuenciaron mediante la plataforma HisSeq4000 con lecturas simples de 76 nts.

12.2. Procesamiento y análisis los datos de secuenciación

El análisis informático fue llevado a cabo a través de la interfase GALAXY (Blankenberg et al., 2010). Los archivos fastq provistos por el servicio de secuenciación corresponden 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. 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 calcula una serie de parámetros que permiten determinar si la calidad y confiabilidad de las secuencias provistas es aceptable. Los parámetros calculados son: valor medio de Q para cada base, índice de calidad por secuencia, el contenido de GC por secuencia, el porcentaje de cada nucleótido para cada posición en la secuencia, el contenido de bases no identificadas (N) por secuencia, la distribución de tamaños de las secuencias, cantidad de secuencias duplicadas, y la existencia de secuencias y Kmers sobrerrepresentadas. Todos estos

parámetros superaron los estándares de calidad esperados para el tipo de secuenciación realizado. El alineamiento de las lecturas de RNA-Seq con el genoma de referencia *M. truncatula* versión Mt4.0 (Tang et al., 2014) se realizó con el programa TopHat2 (Kim et al., 2013). Esta herramienta se encuentra en la opción NGS:RNAseq>TopHat2 y la misma utiliza el programa Bowtie2. 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 fueron analizados con el paquete de análisis Cufflinks que consta de tres herramientas de análisis: Cufflinks, cuffmerge y cuffdiff (Trapnell et al., 2012; Trapnell et al., 2014). La herramienta Cufflinks permitió ensamblar los transcritos para cada condición y se encuentra en la opción NGS_RNAseq > Cufflinks. Para un mejor análisis estadístico se seleccionaron los siguientes parámetros:

- > Reference annotation: 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 luego del CuffMerge fueron analizados con Cuffdiff para detectar transcritos con expresión diferencial. Cuffdiff está ubicado en NGS_RNAseq > CuffDiff. Los parámetros modificados fueron:

- > Library dispersion 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 transcritos por millón de lecturas alineadas) para cada transcritos 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. Mediante el uso de esta herramienta se realizaron los gráficos de box plot mostrando la media y dispersión de los valores de FPKM, así como también, los gráficos vulcano mostrando los genes diferenciales en las distintas comparaciones de a pares.

13. Tinción histoquímica y microscopia

13.1. Tinción histoquímica de GUS

Las tinciones histoquímicas de GUS de raíces y nódulos se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Jefferson et al. (Jefferson et al., 1987). Para los cortes transversales de las RPs pmiR390a y pmiR390a, se embebieron las raíces en agarosa 4 % y luego se realizaron cortes utilizando un micrótopo EMS 5000 *Tissue Slicer (Electron Microscopy Science)*. Los cortes longitudinales de los nódulos y las raíces pTAS3 se realizaron mediante el uso de un criotomo *Thermo Shandon Cryotome FSE*. Los tejidos fueron visualizados y fotografiados utilizando un microscopio invertido OLYMPUS IX51.

13.2. Microscopía óptica y electrónica

Para microscopía óptica y electrónica, se colectaron nódulos de raíces wt y mutantes ago7 crecidas en potes a los 28 dpi con *S. meliloti* 1021, o de las raíces transgénicas OX390, MIM390 y EV crecidas en placas cuadradas. Los nódulos fueron fijados en *buffer* fosfato de potasio 50 mM, pH= 7,4, conteniendo paraformaldehído 2 % (V/V), durante 2 horas a 48 °C. Durante las 2 horas de fijación, se realizó pulsos cortos de vacío suave sobre las muestras hasta que los nódulos se sumergieron. Luego, se incubaron los nódulos en *buffer* fosfato de potasio

50mM, pH= 7,4, conteniendo tetroxido de osmio 1 % (p/V) durante una hora a 48 °C. Se enjuagaron tres veces en el mismo buffer, se deshidrataron pasando por una serie de etanol graduado y se embebieron en una resina epoxy. Mediante un micrótopo se obtuvieron secciones ultrafinas (70 nm), se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión de electrones de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL EE. UU.).

Las secciones de nódulos semifinas (1-2 mm) se tiñeron con azul de toluidina 0,04 % (p/V) y se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido OLYMPUS IX51.

13.2. Microscopía confocal

La microscopía confocal se realizó sobre tejidos de raíz y nódulos no inoculados e inoculados con *S. meliloti* RFP a diferentes tiempos de la interacción simbiótica y sobre las raíces DR5:mRFP transformadas con la construcción OX390 y EV. Se utilizó un microscopio confocal SP5 invertido (*Leica Microsystems*). GFP y RFP se excitaron utilizando láseres de 488 nm y 543 nm, y las emisiones se recogieron entre 498-552 nm y 578-626 nm, respectivamente. Las imágenes se procesaron con el *software LAS Image Analysis (Leica Microsystems)*.

14. Análisis bioinformáticos generales

14.1. Análisis general de secuencias y diseño de *primers*

Las secuencias de los vectores utilizados, los marcos abiertos de lectura, los cromatogramas de la secuenciación de plásmidos, así como también el diseño de *primers*, fueron analizadas mediante el *software* libre UGENE (<http://ugene.net/>)

14.2. Bases de datos de secuencias genómicas

Se utilizó la base de datos genómica de *M. truncatula* versión *Mt4.0* (Tang et al, 2014) disponible públicamente (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y la base de datos de microRNAs miRBASE (<http://www.mirbase.org/>).

14.3. Base de datos de expresión

Se utilizó la base de datos *M. truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA) (<http://mtgea.noble.org>) para analizar los perfiles de expresión de los genes *AGO7*, *SGS3*, *DRD6* y *DCL4* de *M. truncatula* (Benedito et al., 2008).

14.4. BLAST

La secuencia nucleotídica madura de miR390 de *M. truncatula* descrita en el miRBASE fue utilizada como *query* en una búsqueda contra la base de datos genómica de *M. truncatula* mediante un BLASTN.

14.5. Alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas

Los alineamientos múltiples de secuencias de nucleotidos fueron realizados con el programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Posteriormente los alineamientos fueron coloreados utilizando el programa *BoxShade* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

45.6. Diagramas de Venn

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

14.7. Análisis de elementos regulatorios en promotores

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

ANEXO

1. SECUENCIAS

pre-miR390a

CTGTTAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCATAGAATGTCTTCTTTTTTTGGTTCCATTTTATTGATT
GATCTTCUCTTGCGCTATCCATCCTGAGTTTCATGG

pre-miR390b

GAGTATAGGAGGGTCGGTAAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCATTGATAAATGTGTGTACGTGGTA
TTTGGCGCTATCCATCCTGAGTTTCACCGTTCTTCTTACTAGCT

TAS3

ATGAAACCAAAAGACAAATTTGTCAAAGGTCCCAATAAGGAAAATCTCATGCATGTGATGAGT
ACTAGTAGGAGCAAGTTCATGACCACCATGGTCAACCCTTTGAGATTCTGTGACAAAAAGAA
GAAGACATTGGTGGCTCTGAAATTGTAGCTGACAATTCTTCAGCAACTTCAGCATTAGCAGCA
GGTTCATTCTAAATCATCATGGGTGCTATCCTATCTGAGCTTTTTTTTTCACCTTCTCTTTTCT
TAACTTTTTTTTTACTCTACTTGTGTCTTCTTGACCTTGTAAGACCTTTCTTGACCTTGTA
GACCTCACTCTGTGTGCGGTTTTCTTTGTTTTGCTTTTGTGGAAGACGCTATATCGAAATTTG
TTGATATAGAGTTTCGTCTCCGTTTTTCCCTTTTACCACCAACTCATTCTCTTTTCTTGT
CTATCCCTCCTGAGCTAGTTCCATTTTCGCCATTAATGGCTTGAAAATTGGATGAAAAAAG
GACCTTGCAAATGTAAATGTGCAAATTTGGTCTAATTTATTCGATCTTATTATAATTATTATT
GACATTATTATTATTATTGAAATGTAGTAATTTGTAGCTAGCATGCTTTCATCATGTCCCTAA

AL TAS3

ATGAAACCAAAAGACAAATTTGTCAAAGGTCCCAATAAGGAAAATCTCATGCATGTGATGAGTA
CTAGTAGGAGCAAGTTCATGACCACCATGGTCAACCCTTTGAGATTCTGTGACAAAAAGAA
AGACATTGGTGGCTCTGAAATTGTAGCTGACAATTCTTCAGCAACTTCAGCATTAGCAGCAGGT
TCATTCTAAATCATCATGGGTGCTATCCTATCTGAGCTTTTTTTTTCACCTTCTCTTTTCTTAA
TTTTTTTTTACTCTACTTGTGTCTTCTTGACCTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Se indican: subrayado el ORF de *TAS3* y *AL TAS3*, en gris los sitios de unión de miR390 y en negrita y rojo los tasiARFs.

2. PRIMERS

Tabla 6: *Primers* utilizados en este trabajo:

*ID del gen	Nombre	Secuencia	Uso	Referencia
-	AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT	3' RACE	Invitrogen
Medtr2g033380	TAS3N F	GGTCAACCCTTTGAGATTCTGTGAC	3' RACE	Este trabajo
-	UAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3' RACE	Invitrogen
Medtr2g033380	ALTTAS3 F	CACCATGAAACCAAAAGACAAATTTGTCAA	Clonado de	Este trabajo
	ALTTAS3 R	ACAAGGTCAAGAAAAGTCTTACAAGGT	<i>ALTTAS3</i>	
Medtr2g014770	pARF3 F	CACCCCATATCACCCAAACAGAAGCATACC	Clonado de	Este trabajo
	pARF3 R	CCTTTTGCAGGAACAGATGAAGCA	promotor	
Medtr4g060460	pARF4 F	CACCGGACCAATGTGTTGTAATGGGTGC	Clonado de	Este trabajo
	pARF4 R	CAGTGTCGGCTAAGTGGTGAAACT	promotor	
Medtr4g014400	pMIR390a F	CACCGAGGTTGAAAACGGCTGCTAAGC	Clonado de	Este trabajo

	pMIR390a R	GCTATCCCTCCTGAGCTTAACAGATTC	promotor	
Medtr3g031300	pMIR390b F pMIR390b R	CACCCACTACCATCTGGTCAAACTAGGT GAGCTTTACCGACCCTCTATAC	Clonado de promotor	Este trabajo
Medtr2g033380	pTAS3 F pTAS3 R	CACCACCAAGCAGTGAATCCAAGAA TCTTTGTGATCCGAGGTGAATCCT	Clonado de promotor	Este trabajo
Medtr2g033380	LONGTAS3 F LONGTAS3 R	CACCATGAAACCAAAAGACAAATTTGTCAA TTAAGGACATGATGAAAGCATGCT	Clonado de <i>TAS3</i>	Este trabajo
Medtr2g014770	iRNA-ARF2/3/4 F iRNA-ARF2/3/4 R	CACCGGAGCGTCAGACTTTGGGG CGTAGGGTGGGCACAGAAG	Clonado del iRNA contra <i>ARF2/3/4</i>	Este trabajo
-	iRNA-GUS F iRNA-GUS R	CACCGCAACGTCTGGTATCAGCG CTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC	Clonado del iRNA contra <i>GUS</i>	Este trabajo
Medtr3g031300	pre-MIR390b F pre-MIR390b R	CACCGAGTATAGGAGGGTCGGTAAAGCTC AGCTAGTAAGAAGAACCGGTGAAA	Clonado del pre-miR390b	Este trabajo
-	IPS1 F IPS1 R	CACCAGGTTATTCATCTTTTAGGGGATGG GGTCTGACTATTCTCCAAACTTATTAGA	Clonado del <i>target mimicry</i> de miR390	(Franco-Zorrilla et al., 2007)
-	MIM390 F MIM390 R	CTGGCGCTATCCTCTATCCTGAGCTT TTTCAGAGGG AGATAA AA AAGCTCAGGATAGAGGATAGCGCC AGCTTCGGTTCCCTCG	Clonado del <i>target mimicry</i> de miR390	Este trabajo
-	pK7GWIWG2D (II) F pK7GWIWG2D (II) R	GATGACGCACAATCCCACTATCC CGTAAAACGGCTTGTCCTCG	PCR pK7GWIWG2D(I I)	
Medtr5g042590	AGO7 F AGO7 R	TGGCTTAACTGAGGAGGCAACTG CACATGACCTCCATCTCCAAGC	PCR semicuantitativa	(Zhou et al., 2013)
Medtr4g097170	HIS3L F HIS3L R	ATCCAAAGGCGGCTGCATA CTTTGCTTGGTGTGTTTAGATGG	qPCR	(Ariel et al., 2010)
Medtr2g008050	ACT11 F ACT11 R	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC	qPCR	(Ariel et al., 2010)

Medtr8g100050	ARF2 F ARF2 R	TCGTCAAAGTAAGCATGGACCC CCATCTTTCTTCATCAGTTGCAGGA	qPCR	(Reynoso et al., 2013) Este trabajo
Medtr2g014770	ARF3 F ARF3 R	CACTTCAGCAAAGCTAGAATTTCCA TTTGAACCAGGATAGCACCTCCCT	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
Medtr4g060460	ARF4 F ARF4 R	AGAAACGGTCTTCCTGAATCAAT TCATTTTGAATCTTGCCCTATGGT	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
-	Común <i>primer</i> R	GTGCAGGGTCCGAGGT	qPCR	(Varkonyi-gasic et al., 2007)
Medtr8g106150	CRE1 F CRE1 R	GCACCACCCTTTGGCTTCTAAG CCACTAAGTAGCGGCCTTTCCG	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
Medtr3g415670	ENOD11 F ENOD11 R	ATCCACAATATGCCTCCAA AGGAAGTGGTGGCTTTAGCA	qPCR	(Gonzalez-Rizzo et al., 2006)
X80264	ENOD40 F ENOD40 R	AGGAATCCATTGCCTTTTTGTGAC CCCTACACTCTCCCTCCA	qPCR	(Gonzalez-Rizzo et al., 2006)
Medtr7g085810	ERN1 F ERN1 R	GGAAGATGGTGTGTTGCTT TGTTGGATTGTGAACCTGACTC	qPCR	(Andriankaja et al., 2007)
Medtr4g097170	HIS3L F HIS3L R	ATCCAAAGGCGGCTGCATA CTTTGCTTGGTGTGTTAGATGG	qPCR	(Ariel et al., 2010)
Medtr4g014400 Medtr3g031300	miR390 F	TCGCTAAGCTCAGGAGGGAT	qPCR	(Zhou et al., 2013)
Medtr1g056530	NF-YA1 F NF-YA1 R	AAAATATGGCTATGCAACCTGTTTA CAACTGACATCTTACAATCATCTGG	qPCR	(Combiér et al., 2006)
Medtr5g099060	NIN F NIN R	GAAGCCATGACTATCCGCGTC CACCACAACCTGATGCACCAC	qPCR	(Smit et al., 2007)
Medtr8g020840	NSP1 F NSP1 R	GTGGTTAGAAAATCTGGTGGG GTGTCAATGCTCGAAGACCA	qPCR	(Smit et al., 2005)
Medtr3g072710	NSP2 F NSP2 R	GACACACTTGCTGCTTTCCA AATGCGGTTATCCGAAGATG	qPCR	(Gonzalez-Rizzo et al., 2006)

Medtr2g033380	TAS3 F TAS3 R	TGGGTGCTATCCTATCTGAGC AAAAGGGAAAAACGGAGACG	qPCR	(Reynoso et al., 2013)
Medtr2g033380	TAS3ORF F TAS3ORF R	CACCATGAAACCAAAGACAAATTTGTCAA TTAGAATGAACCTGCTGCTAATGC	qPCR	Este trabajo
Medtr2g033380	tasiARF F	TCGCTTTCTTGACCTTGTA	qPCR	(Zhou et al., 2013)
	U6 F	GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA	qPCR	(Turner et al., 2013a)
-	M13 F M13 R	GTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación <i>pENTR/D-TOPO</i>	
-	pK7WG2D,1 F pK7WG2D,1 R	GATGACGCACAATCCCACTATCC CGTAAAACGGCTTGCCCG	Secuenciación pK7WG2D,1	
-	pKGWFS7,0 F pKGWFS7,0 R	CCTTAGGCGACTTTTGAACG GCTTCATGTGGTCGGGGTAG	Secuenciación pKGWFS7,0	
Medtr4g014400 Medtr3g031300	RT-miR390	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACGGCGCT	Stem-loop RT	(Zhou et al., 2013)
Medtr2g033380	RT-tasiARFs	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACGAGGTC	Stem-loop RT	(Zhou et al., 2013)
	RT-U6	GTGCAGGGTCCGAGGTTTGGACCATTCTCGAT	Stem-loop RT	(Turner et al., 2013a)

**Medicago truncatula* gen ID Mt4.0 o *GenBank Accession Number*

BIBLIOGRAFÍA

- Abel S, Theologis a** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**: 9–17
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC** (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207–221
- Ben Amor B, Wirth S, Merchan F, Laporte P, d'Aubenton-Carafa Y, Hirsch J, Maizel A, Mallory A, Lucas A, Deragon JM, et al** (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. *Genome Res* **19**: 57–69
- Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F** (2007) AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor Dependent Mt ENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis-Regulatory Motif. *Plant Cell* **19**: 2866–2885
- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GED, Ayax C, Lévy J, Debelle F, Baek JM, Kalo P, et al** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* **303**: 1364–1367
- Andrews S.** (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Ariel F, Brault-Hernandez M, Laffont C, Huault E, Brault M, Plet J, Moison M, Blanchet S, Ichante JL, Chabaud M, et al** (2012) Two Direct Targets of Cytokinin Signaling Regulate Symbiotic Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **24**: 3838–3852
- Ariel F, Diet A, Verdenaud M, Gruber V, Frugier F, Chan R, Crespi M** (2010) Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1. *Plant Cell* **22**: 2171–2183
- Arrighi J-F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Ghérardi M, Huguet T, et al** (2006) The *Medicago truncatula*; Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes. *Plant Physiol* **142**: 265 LP-279
- Aukerman MJ, Sakai H** (2003) Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes. *Plant Cell* **15**: 2730–2741
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP** (2006) A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **127**: 565–577
- Axtell MJ, Snyder JA, Bartel DP** (2007) Common Functions for Diverse Small RNAs of Land Plants. **19**: 1750–1769
- Bailey-Serres J** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci* **4**: 142–148
- Bailey-Serres J, Sorenson R, Juntawong P** (2009) Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci* **14**: 443–453
- Bartel DP** (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**: 281–297
- Baudin M, Laloum T, Lepage A, Ripodas C, Ariel F, Frances L, Crespi M, Gamas P, Blanco FA, Zanetti ME, et al** (2015) A phylogenetically conserved group of NF-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes. *Plant Physiol* **169**: pp.01144.2015
- Bazin J, Baerenfaller K, Gosai SJ, Gregory BD, Crespi M, Bailey-Serres J** (2017) Global analysis of ribosome-associated noncoding RNAs unveils new modes of translational regulation. *Proc Natl Acad Sci* 201708433
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, et al** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55**: 504–513
- Bensmihen S** (2015) Hormonal Control of Lateral Root and Nodule Development in Legumes. *Plants* **4**: 523–547
- Bianco C, Defez R** (2010) Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4626–4632

- Biswas B, Chan PK, Gresshoff PM** (2009) A Novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol Plant* **2**: 487–499
- Blankenberg D, Gordon A, Kuster G Von, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A, Team G, Trimmer R** (2010) Manipulation of FASTQ data with Galaxy GENERATION SEQUENCING READS FOR MAPPING AND ANALYSIS. **26**: 1783–1785
- Boisson-dernier A, Andriankaja A, Chabaud M, Niebel A, Journet E, Barker DG, Carvalho-niebel F De** (2005) MtENOD11 Gene Activation During Rhizobial Infection and Mycorrhizal Arbuscule Development Requires a Common AT-Rich-Containing Regulatory Sequence. *MPMI*. **18**: 1269–1276
- Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, Laffont C, Plet J, Combier JP, Niebel A, Crespi M, Frugier F** (2008) MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J* **54**: 876–887
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, Bailey-Serres J** (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot* **96**: 647–660
- Breakspear A, Liu C, Roy S, Stacey N, Rogers C, Trick M, Morieri G, Mysore KS, Wen J, Oldroyd GED, et al** (2014) The Root Hair “Infectome” of *Medicago truncatula* Uncovers Changes in Cell Cycle Genes and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection. *Plant Cell* **26**: 4680–4701
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (80-) **320**: 1185–1190
- Buchan JR, Parker R** (2009) Eukaryotic Stress Granules : The Ins and Out of Translation. *Mol Cell*. **36** (6): 932
- Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J* **34**: 13–26
- Bustos-Sanmamed P, Mao G, Deng Y, Elouet M, Khan GA, Bazin J, Turner M, Subramanian S, Yu O, Crespi M, et al** (2013) Overexpression of miR160 affects root growth and nitrogen-fixing nodule number in *Medicago truncatula*. *Funct Plant Biol* **40**: 1208–1220
- Cabrera J, Barcala M, Garc A, Rio-mach A, Jaubert- S, Favery B, Maizel A, Ruiz-ferrer V, Fenoll C, Escobar C** (2016) Differentially expressed small RNAs in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica* : a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. 1625–1640
- Cakir O, Candar-Cakir B, Zhang B** (2016) Small RNA and degradome sequencing reveals important microRNA function in *Astragalus chrysochlorus* response to selenium stimuli. *Plant Biotechnol J* **14**: 543–556
- Camerini S, Senatore B, Lonardo E, Imperlini E, Bianco C, Moschetti G, Rotino GL, Campion B, Defez R** (2008) Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. *Arch Microbiol* **190**: 67–77
- Capoen W, Sun J, Wysham D, Otegui MS, Venkateshwaran M, Hirsch S, Miwa H, Downie JA, Morris RJ, Ane J-M, et al** (2011) Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 14348–14353
- Catoira R, Timmers ACJ, Maillet F, Galera C, Penmetza RV, Cook D, Dénarié J, Gough C** (2001) The HCL gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. **1518**: 1507–1518
- Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B** (2012) The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**: 423–438
- Cerri MR, Frances L, Laloum T, Auriac M-C, Niebel A, Oldroyd GED, Barker DG, Fournier J, de Carvalho-Niebel F** (2012) *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiol* **160**: 2155–2172

- Cerri MR, Wang Q, Stolz P, Folgmann J, Frances L, Katzer K, Li X, Heckmann AB, Wang TL, Downie JA, et al** (2017) The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytol* **215**: 323–337
- Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG** (2006) Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation. *Medicago trunculata Handb* **2**: 1–8
- Chandler JW** (2016) Auxin response factors. *Plant Cell Environ* **39**: 1014–1028
- Charon C, Johansson C, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M** (1997) enod40 induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 8901 LP-8906
- Charpentier M, Sun J, Martins TV, Radhakrishnan G V, Findlay K, Soumpourou E, Thouin J, Véry A, Sanders D, Morris RJ, et al** (2016) Symbiotic Calcium Oscillations. *Science* (80-) **352**: 1102–5
- Chen X** (2013) NIH Public Access. **22**: 361–367
- Chen X** (2004) A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* (80-) **303**: 2022–2025
- Clúa J, Roda C, Zanetti ME, Blanco FA** (2018) Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*. **9**, 125
- Combiér J, Frugier F, Billy F De, Boualem A, El-yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M, et al** (2006) MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula* service MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes and develop.* **20**: 3084–3088
- Cooper JB** (1994) Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell* **6**: 215–225
- Crespi MD, Jurkevitch E, Poiret M, Aubenton-carafa Y, Petrovics G, Kondorosi E, Kondorosi A** (1994) enod40, a gene expressed during nodule codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO*. **13**: 5099–5112
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC** (2011) Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *Plant Cell*. **23**: 431–442
- D’haeseleer K, Den Herder G, Laffont C, Plet J, Mortier V, Lelandais-Brière C, de Bodt S, de Keyser A, Crespi M, Holsters M, et al** (2011) Transcriptional and post-transcriptional regulation of a NAC1 transcription factor in *Medicago truncatula* roots. *New Phytol* **191**: 647–661
- Delaux PM, Radhakrishnan G, Oldroyd G** (2015) Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. *Curr Opin Plant Biol* **26**: 95–99
- Derrien B, Baumberger N, Schepetilnikov M, Viotti C, De Cillia J, Ziegler-Graff V, Isono E, Schumacher K, Genschik P** (2012) Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 15942–15946
- Desbrosses GJ, Stougaard J** (2011) Root Nodulation: A Paradigm for How Plant-Microbe Symbiosis Influences Host Developmental Pathways. *Cell Host Microbe* **10**: 348–358
- De Luis A, Markmann K, Cognat V, Holt DB, Charpentier M, Parniske M, Stougaard J, Voinnet O** (2012) Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **160**: 2137–2154
- De Smet I** (2012) Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytol* **193**: 867–873
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF d., Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, et al** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* **134**: 681–690
- De Smet I, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T** (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol* **60**: 871–887
- Devers EA, Branscheid A, May P, Krajinski F** (2011) Stars and Symbiosis : MicroRNA- and MicroRNA * -Mediated Transcript Cleavage Involved in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis.

- Plant Physiol **156**: 1990–2010
- Dhir A, Proudfoot NJ** (2013) Feed backwards model for microRNA processing and splicing in plants. *EMBO Rep* **14**: 581–582
- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd GED** (2008) Abscisic Acid Coordinates Nod Factor and Cytokinin Signaling during the Regulation of Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**: 2681–2695
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colón-Carmona a, Rost TL** (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1648–1657
- Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernández-Barrera A, Shishkova S, González I** (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot* **97**: 903–915
- Dubrovsky JG, Napsucially-Mendivil S, Duclercq J, Cheng Y, Shishkova S, Ivanchenko MG, Friml J, Murphy AS, Benková E** (2011) Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol* **191**: 970–983
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benkova E** (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 8790–8794
- Eckardt NA** (2013) Alternative Splicing. *Plant Cell* **25**: 3639 LP-3639
- Ehrhardt AG, Frankish N, Isenberg G** (1996) A large-conductance K⁺ channel that is inhibited by the cytoskeleton in the smooth muscle cell line DDT1MF-2. *J Physiol* **496**: 663–676
- Endo Y, Iwakawa H, Tomari Y** (2013) Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Rep* **14**: 652 LP-658
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966
- Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Petrescu AMR, Leach AM, de Vries W** (2013) Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20130116
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P** (2005) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred . I . Accuracy Assessment. 175–185
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC** (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **16**: 939–944
- FÅHRAEUS G** (1957) The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology* **16**: 374–381
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61–76
- Finet C, Berne-Dedieu A, Scutt CP, Marlétaz F** (2013) Evolution of the ARF Gene Family in Land Plants: Old Domains, New Tricks. *Mol Biol Evol* **30**: 45–56
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* **39**: 1033–1037
- Friso G, van Wijk KJ** (2015) Posttranslational Protein Modifications in Plant Metabolism. *Plant Physiol* **169**: 1469–1487
- Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczyglowski K** (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* **13**: 115–120
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B** (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**: 1053–1057
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA** (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* (80-) **320**: 889–892

- Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P** (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* **49**: 683–693
- Geurts R, Lillo A, Bisseling T** (2012) Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 438–443
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell Online* **18**: 2680–2693
- Graham PH, Vance CP** (2014) Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* **131**: 872–877
- Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Draxl S, Brachmann A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Wang TL, et al** (2010) NENA, a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13, Is Required for Rhizodermal Infection by Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Rhizobia but Dispensable for Cortical Endosymbiotic Development. *Plant Cell Online* **22**: 2509–2526
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubo R** (2008) The Vienna RNA Websuite. **36**: 70–74
- Gruber N, Galloway JN** (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**: 293–296
- Hayashi T, Banba M, Shimoda Y, Kouchi H, Hayashi M, Imaizumi-Anraku H** (2010) A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* **63**: 141–154
- He F, Xu C, Fu X, Shen Y, Guo L, Leng M, Luo K** (2018) TRANS-ACTING SHORT INTERFERING RNA Module Mediates Lateral Root Growth under Salt Stress via the Auxin Pathway. *Plant Physiol* **177**: 775 LP-791
- Heckmann AB, Sandal N, Bek AS, Madsen LH, Jurkiewicz A, Nielsen MW, Tirichine L, Stougaard J** (2011) Cytokinin Induction of Root Nodule Primordia in *Lotus japonicus* Is Regulated by a Mechanism Operating in the Root Cortex. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 1385–1395
- Held M, Hou H, Miri M, Huynh C, Ross L, Hossain MS, Sato S, Tabata S, Perry J, Wang TL, et al** (2014) *Lotus japonicus* Cytokinin Receptors Work Partially Redundantly to Mediate Nodule Formation. *Plant Cell* **26**: 678–694
- Herrbach V, Remblière C, Gough C, Bensmihen S** (2014) Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*. *J Plant Physiol* **171**: 301–310
- Hirsch S, Kim J, Munoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED** (2009) GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**: 545–557
- Hofer JMI, Noel Ellis TH** (2014) Developmental specialisations in the legume family. *Curr Opin Plant Biol* **17**: 153–158
- Hofferek V, Mendrinna A, Gaude N, Krajinski F, Devers EA** (2014) MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **14**: 199
- Horváth B, Yeun LH, Domonkos Á, Halász G, Gobbato E, Ayaydin F, Miró K, Hirsch S, Sun J, Tadege M, et al** (2011) *Medicago truncatula* *IPD3* Is a Member of the Common Symbiotic Signaling Pathway Required for Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 1345–1358
- Hou C, Lee W, Chou H, Chen A, Chou S-J, Chen H-M** (2016) Global Analysis of Truncated RNA Ends Reveals New Insights into Ribosome Stalling in Plants. *Plant Cell* tpc.00295.2016
- Hunt AG** (2012) RNA Regulatory Elements and Polyadenylation in Plants. *Front Plant Sci* **2**: 1–5
- Hunter C, Sun H, Poethig RS** (2003) Is an ARGONAUTE Family Member. **13**: 1734–1739
- Huo X, Schnabel E, Hughes K, Frugoli J** (2006) RNAi Phenotypes and the Localization of a Protein::GUS Fusion Imply a Role for *Medicago truncatula* PIN Genes in Nodulation. *J Plant Growth Regul* **25**: 156–165
- Hutvagner G, Zamore PD** (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.

- Science (80-) **297**: 2056–2060
- Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhara I, Meshi T, Ishikawa M** (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* **39**: 282–291
- Ishikawa H, Evans ML** (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol* **109**: 725–7
- Iwakawa H, Tomari Y** (2013) Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell* **52**: 591–601
- Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li Y, Shukla LI, Matts J, Hoyt P, Macmil SL, Wiley GB, Roe BA, Zhang W, et al** (2009) Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytol.* **184** (1) 85–98
- Jardinaud M-F, Boivin S, Rodde N, Catrice O, Kisiala A, Lepage A, Moreau S, Roux B, Cottret L, Sallet E, et al** (2016) A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiol* **171**: 2256–2276
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–7
- Journet E, de Carvalho-Niebel F, Andriankaja A, Huguet T, Barker DG** (2006) Rhizobial inoculation and nodulation of *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula Handb* 1–6
- Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MCP** (2004) microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* **428**: 84
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al** (2005) Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2, a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. *Science* (80) **308**: 1786 LP-1789
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, et al** (2006) From The Cover: A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 359–364
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193–195
- Kawaguchi M, Minamisawa K** (2010) Plant-microbe communications for symbiosis. *Plant Cell Physiol* **51**: 1377–1380
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 460–465
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J** (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**: 823–839
- Kevei Z, Lounon G, Mergaert P, Horvath G V., Kereszt A, Jayaraman D, Zaman N, Marcel F, Regulski K, Kiss GB, et al** (2007) 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase1 Interacts with NORK and Is Crucial for Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Online* **19**: 3974–3989
- Kieber JJ, Schaller GE** (2014) Cytokinins. *Arab B* **12**: e0168
- Kim D, Perteza G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL** (2013) TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions , deletions and gene fusions. *Genome Biology.* **14**: 1–13
- Kisiala A, Laffont C, Emery RJN, Frugier F** (2013) Bioactive Cytokinins Are Selectively Secreted by *Sinorhizobium meliloti* Nodulating and Nonnodulating Strains. *Mol Plant-Microbe Interact* **26**: 1225–1231
- Klaus-Heisen D, Nurisso A, Pietraszewska-Bogiel A, Mbengue M, Camut S, Timmers T, Pichereaux C, Rossignol M, Gadella TWJ, Imberty A, et al** (2011) Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-

- associated kinase-4. *J Biol Chem* **286**: 11202–11210
- Köhler A, Hurt E** (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 761–773
- Korasick DA, Westfall CS, Lee SG, Nanao MH, Dumas R, Hagen G, Guilfoyle TJ, Jez JM, Strader LC** (2014) Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 5427–5432
- Kosslak RM, Bohlool BB** (1984) Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol* **75**: 125–130
- Kozomara A, Griffiths-jones S** (2014) miRBase : annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acid Res.* **42**: 68–73
- Krasnikova MS, Goryunov D V, Troitsky A V, Solovyev AG, Ozerova L V, Morozov SY** (2013) Peculiar Evolutionary History of miR390-Guided TAS3-Like Genes in Land Plants. *The Scientific World Journal*. 924153
- Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, De Bruijn F, et al** (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**: 422–426
- Kuppusamy KT, Ivashuta S, Bucciarelli B, Vance CP, Gantt JS, Vandenbosch KA** (2009) Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **151**: 1155–1166
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652–655
- Laloum T, Baudin M, Frances L, Lepage A, Billault-Penneteau B, Cerri MR, Ariel F, Jardinaud MF, Gamas P, De Carvalho-Niebel F, et al** (2014) Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J* **79**: 757–768
- Laporte P, Lepage A, Fournier J, Catrice O, Moreau S, Jardinaud M, Mun J, Larrainzar E, Cook DR, Gamas P, et al** (2014) The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot.* **65**: 481–494
- Laufs P** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* **131**: 4311–4322
- Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplace L** (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: Fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* **18**: 1360–1385
- Law JA, Jacobsen SE** (2011) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11**: 204–220
- Lee HW, Kim NY, Lee DJ, Kim J** (2009) LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**: 1377–1389
- Lee KH, Larue TA** (1992) Exogenous Ethylene Inhibits Nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol* **100**: 1759–1763
- Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, Calenge F, Frugier F, Hartmann C, Gouzy J, Crespi M** (2009) Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell* **21**: 2780–96
- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet E-P, Ané J-M, Lauber E, Bisseling T, et al** (2004) A Putative Ca²⁺ and Calmodulin- Dependent Protein Kinase Required. *Science* **303**: 1361–4
- Li S, Le B, Ma X, Li S, You C, Yu Y, Zhang B, Liu L, Gao L, Shi T, et al** (2016) Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. *Elife* **5**: 1–24
- Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, et al** (2013) MicroRNAs inhibit

- the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in arabidopsis. *Cell* **153**: 562–574
- Li X, Lei M, Yan Z, Wang Q, Chen A, Sun J, Luo D, Wang Y** (2014) The REL3-mediated TAS3-tasiRNA pathway integrates auxin and ethylene signaling to regulate nodulation in *Lotus japonicus*. *New Phytol* **201**: 531–544
- Liscum E, Reed JW** (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**: 387–400
- Liu B, Chen Z, Song X, Liu C, Cui X, Zhao X, Fang J, Xu W, Zhang H, Wang X, et al** (2007) *Oryza sativa* Dicer-like4 Reveals a Key Role for Small Interfering RNA Silencing in Plant Development. *Plant Cell* **19**: 2705–2718
- Löfke C, Luschnig C, Kleine-Vehn J** (2013) Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech Dev* **130**: 82–94
- Lorković ZJ** (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci* **14**: 229–236
- Madsen EB, Antolín-Llovera M, Grossmann C, Ye J, Vieweg S, Broghammer A, Krusell L, Radutoiu S, Jensen ON, Stougaard J, et al** (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* **65**: 404–417
- Mähönen AP, Tusscher K Ten, Siligato R, Smetana O, Díaz-Triviño S, Salojärvi J, Wachsman G, Prasad K, Heidstra R, Scheres B** (2014) PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* **515**: 125–129
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44
- Mallory AC, Dugas D V, Bartel DP, Bartel B** (2004) MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs. *Curr Biol* **14**: 1035–1046
- Manjunath S, Williams AJ, Bailey-Serres J** (1999) Oxygen deprivation stimulates Ca²⁺-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J* **19**: 21–30
- Marin E, Jouannet V, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A** (2010) miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *Plant Cell*. **22**: 1104–1117
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GED** (2007) *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiol* **144**: 324–335
- Mathesius U, Schlaman HRM, Spaink HP, Sautter C, Rolfe BG, Djordjevic MA** (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J* **14**: 23–34
- Meade HM, Signer ER** (1977) Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2076–2078
- Messinese E, Mun J, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Loughon G, Schornack S, Bono J, Cook DR, Ané J** (2007) A Novel Nuclear Protein Interacts With the Symbiotic DMI3 Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact.* **20**: 912–921
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa R V., Starker CG, Doll J, Kalo P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, et al** (2007) An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction. *Plant Cell* **19**: 1221–1234
- Mitra RM, Gleason C a, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GED, Long SR** (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4701–4705
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S,**

- Sandberg G, Kakimoto T** (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 16598–16603
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC** (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* **133**: 128–141
- Mulder L, Lefebvre B, Cullimore J, Imberty A** (2006) LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**: 801–809
- Müller B, Sheen J** (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**: 1094–1097
- Murakami E, Cheng J, Gysel K, Bozsoki Z, Kawaharada Y, Hjuler CT, Sørensen KK, Tao K, Kelly S, Venice F, et al** (2018) Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signalling in *Lotus japonicus*. *Elife* **7**: 1–21
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K** (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**: 101–104
- Nagasaki H, Itoh J -i., Hayashi K, Hibara K -i., Satoh-Nagasawa N, Nosaka M, Mukouhata M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M, et al** (2007) The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 14867–14871
- Nagata M, Suzuki A** (2014) Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation in Leguminous Plants. *Adv Biol Ecol Nitrogen Fixat* 112–128
- Naito T, Yamashino T, Kiba T, Koizumi N, Kojima M, Sakakibara H, Mizuno T** (2014) A Link between Cytokinin and ASL9 (ASYMMETRIC LEAVES 2 LIKE 9) That Belongs to the AS2 / LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) Family Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **5**: 1269-78.
- Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK** (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**: 175–187
- Nishimura R, Hayashit M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anrakull H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, et al** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**: 426–429
- Nizampatnam NR, Schreier SJ, Damodaran S, Adhikari S, Subramanian S** (2015) MicroRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *Plant J* **84**: 140–153
- Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP** (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev.* **2**: 750–755
- Nontachaiyapoom S, Scott PT, Men AE, Kinkema M, Schenk PM, Gresshoff PM** (2007) Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**: 769–780
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura KI, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S, Shikazono N, Tanaka A, et al** (2005) Klavier (klv), A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J* **44**: 505–515
- Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M** (2009) Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol* **50**: 67–77
- Okamoto S, Shinohara H, Mori T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M** (2013) Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat Commun* **4**: 1–7
- Okumura KI, Goh T, Toyokura K, Kasahara H, Takebayashi Y, Mimura T, Kamiya Y, Fukaki H**

- (2013) GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell Physiol* **54**: 406–417
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M** (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 118–130
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, et al** (2005) Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in Arabidopsis thaliana: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**: 444 LP-463
- Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR** (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835–49
- Oldroyd GED, Long SR** (2003) Identification and Characterization of Nodulation- Signaling Pathway 2 , a Gene of *Medicago truncatula* Involved in Nod Factor Signaling 1. **131**: 1027–1032
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio L Lo, Skriver K** (2005) NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci* **10**: 79–87
- Onouchi H, Haraguchi Y, Nakamoto M, Kawasaki D, Nagami-Yamashita Y, Murota K, Kezuka-Hosomi A, Chiba Y, Naito S** (2008) Nascent peptide-mediated translation elongation arrest of Arabidopsis thaliana CGS1 mRNA occurs autonomously. *Plant Cell Physiol* **49**: 549–556
- Ovchinnikova E, Journet E-P, Chabaud M, Cosson V, Ratet P, Duc G, Fedorova E, Liu W, den Camp RO, Zhukov V, et al** (2011) IPD3 Controls the Formation of Nitrogen-Fixing Symbiosomes in Pea and *Medicago* Spp. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 1333–1344
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: 1–16
- Pačes V, Werstiuk E, Hall RH** (1971) Conversion of adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiol* **48**: 775 LP-778
- Pan H, Stonoha-Arther C, Wang D** (2018) *Medicago* Plants Control Nodulation by Regulating Proteolysis of the Receptor-Like Kinase DMI2. *Plant Physiol* **177**: 792–802
- Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJM** (2003) Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* **132**: 1382–1390
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 3691–3696
- Penmetsa R V, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR** (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131**: 998–1008
- Penmetsa RV, Cook DR** (1997) A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* **275**: 527 LP-530
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408
- Péter Kaló, Cynthia Gleason, Anne Edwards, John Marsh, Raka M. Mitra, Sibylle Hirsch, Julia Jakab, Sarah Sims, Sharon R. Long, Jane Rogers, Gyorgy B. Kiss, J. Allan Downie GEDO** (2005) Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2 , a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. *Science*. **308**: 1786–1790
- Phillips DA, Torrey JG** (1970) Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Physiol Plant* **23**: 1057–1063
- Pierre-Jerome E, Moss BL, Nemhauser JL** (2013) Tuning the auxin transcriptional response. *J Exp Bot* **64**: 2557–2563
- Pislariu CI, D. Murray J, Wen J, Cosson V, Muni RRD, Wang M, A. Benedito V, Andriankaja A,**

- Cheng X, Jerez IT, et al** (2012) A *Medicago truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Physiol* **159**: 1686–1699
- Plet J, Wasson A, Ariel F, Le Signor C, Baker D, Mathesius U, Crespi M, Frugier F** (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* **65**: 622–633
- Prayitno J, Rolfe BG, Mathesius U** (2006) The Ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol* **142**: 168–180
- Quandt H-J** (1993) Transgenic Root Nodules of *Vicia hirsuta*: A Fast and Efficient System for the Study of Gene Expression in Indeterminate-Type Nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 699
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP** (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **20**: 3407–3425
- Rampey RA, LeClere S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G, Bartel B** (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol* **135**: 978–988
- Reid DE, Nadzieja M, Novak O, Heckmann AB, Sandal N, Stougaard J** (2017) Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiol* **175**: 361–75
- Reynoso MA, Blanco FA, Bailey-Serres J, Crespi M, Zanetti ME** (2013) Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *Plant J* **73**: 289–301
- Ried MK, Antolín-Llovera M, Parniske M** (2014) Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *Elife* **3**: 1–17
- Robert HS, Friml J** (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 325
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP** (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24
- Rolfe BG, Gressho PM** (1988) Nodule initiation. *Gene Expr* **39**: 297–319
- Roux B, Rodde N, Jardinaud MF, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E, Moreau S, et al** (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* **77**: 817–837
- Roy S, Robson F, Lilley J, Liu C-W, Cheng X, Wen J, Walker S, Sun J, Cousins D, Bone C, et al** (2017) MtLAX2, a Functional Homologue of the *Arabidopsis* Auxin Influx Transporter AUX1, Is Required for Nodule Organogenesis. *Plant Physiol* **174**: 326 LP-338
- Saha S, Dutta A, Bhattacharya A, DasGupta M** (2014) Intracellular Catalytic Domain of Symbiosis Receptor Kinase Hyperactivates Spontaneous Nodulation in Absence of Rhizobia. *Plant Physiol* **166**: 1699–1708
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, et al** (2007) NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**: 610–624
- Sakakibara H** (2006) CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 431–449
- Sanchez Carranza AP, Singh A, Steinberger K, Panigrahi K, Palme K, Dovzhenko A, Dal Bosco C** (2016) Hydrolases of the ILR1-like family of *Arabidopsis thaliana* modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* **6**: 24212
- Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M** (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* **5**: 4983
- Sato EM, Hijazi H, Bennett MJ, Vissenberg K, Swarup R** (2015) New insights into root gravitropic signalling. *J Exp Bot* **66**: 2155–2165

- Schallus T, Jaechk C, Fehér K, Palma AS, Liu Y, Simpson JC, Mackeen M, Stier G, Gibson TJ, Feizi T, et al** (2008) Malectin: A Novel Carbohydrate-binding Protein of the Endoplasmic Reticulum and a Candidate Player in the Early Steps of Protein N-Glycosylation. *Mol Biol Cell* **19**: 3404–3414
- Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J** (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**: 191–195
- Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM** (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* **299**: 109–112
- Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C** (2001) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**: 1771–1783
- Shaw SL, Long SR** (2003) Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* roots hair cells. *Plant Physiol* **131**: 976–984
- Shen C, Yue R, Sun T, Zhang L, Xu L, Tie S, Wang H, Yang Y** (2015) Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* **6**: 1–13
- Shu Y, Liu Y, Zhang J, Song L, Guo C** (2016) Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Superfamily Genes and their Responses to Abiotic Stress in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* **6**: 1247
- Shuai B, Reynaga-Peña CG, Springer PS** (2002) The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol* **129**: 747–761
- Simonini S, Bencivenga S, Trick M, Østergaard L** (2017) Auxin-Induced Modulation of ETTIN Activity Orchestrates Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **29**: 1864 LP-1882
- Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M, Parniske M** (2014) CYCLOPS, A DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* **15**: 139–152
- Smit P** (2005) NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. *Science* **308**: 1789–1791
- Smit P** (2007) Nod factor signaling and infection in *Rhizobium-legume* symbiosis.
- Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T** (2007) *Medicago* LYK3, an Entry Receptor in Rhizobial Nodulation Factor Signaling. *Plant Physiol* **145**: 183 LP-191
- Soyano T, Kouchi H, Hirota A, Hayashi M** (2013) NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1003352
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, et al** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962
- Sturtevant DB, Taller BJ** (1989) Cytokinin Production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol* **89**: 1247–1252
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**: 961–970
- Suzuki T, Ito M, Kawaguchi M** (2013) Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front Plant Sci* **4**: 1–6
- Suzuki A, Akune M, Kogiso M, Imagama Y, Osuki KI, Uchiumi T, Higashi S, Han SY, Yoshida S, Asami T, et al** (2004) Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* **45**: 914–922
- Swarup R, Péret B** (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. *Front Plant Sci* **3**: 1–11

- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, et al** (2014) An improved genome release (version Mt4 . 0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**:312
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP** (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**: 178–192
- Tian CF, Garnerone A-M, Mathieu-Demaziere C, Masson-Boivin C, Batut J** (2012) Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 6751–6756
- Tirichine L, James EK, Sandal N, Stougaard J** (2006) Spontaneous Root-Nodule Formation in the Model Legume *Lotus japonicus* : A Novel Class of Mutants Nodulates in the Absence of Rhizobia. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 373–382
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrektsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**: 104–107
- Tiwari SB** (2003) The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *Plant Cell Online* **15**: 533–543
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L** (2012) Articles Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* **31**: 46–53
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L** (2014) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7** (3): 562-79
- Turner M, Adhikari S, Subramanian S** (2013a) Optimizing stem-loop qPCR assays through multiplexed cDNA synthesis of U6 and miRNAs. *Plant Signal Behav* **8**: e24918
- Turner M, Nizampatnam NR, Baron M, Coppin S, Damodaran S, Adhikari S, Arunachalam SP, Yu O, Subramanian S, Science P, et al** (2013b) Ectopic Expression of miR160 Results in Auxin Hypersensitivity , Cytokinin Hyposensitivity , and Inhibition of Symbiotic Nodule Development in Soybean *Plant Physiol* . **162**: 2042–2055
- Van Zeijl A, Op Den Camp RHM, Deinum EE, Charnikhova T, Franssen H, Op Den Camp HJM, Bouwmeester H, Kohlen W, Bisseling T, Geurts R** (2015) Rhizobium Lipochitooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in *Medicago truncatula* Roots. *Mol Plant* **8**: 1213–1226
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **18** (3) 7
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* **136**: 1005–1016
- Varkonyi-gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP** (2007) Protocol : a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **12**: 1–12
- Varma Penmetsa R, Uribe P, Anderson J, Lichtenzweig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, et al** (2008) The *Medicago truncatula* ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant J* **55**: 580–595
- Venkateshwaran M, Jayaraman D, Chabaud M, Genre A, Balloon AJ, Maeda J, Forshey K, den Os D, Kwiecien NW, Coon JJ, et al** (2015) A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 9781–9786
- Vernié T, Kim J, Frances L, Ding Y, Sun J, Guan D, Niebel A, Gifford ML, de Carvalho-Niebel F, Oldroyd GED** (2015) The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root. *Plant Cell* **27**: tpc.15.00461
- Vernie T, Moreau S, de Billy F, Plet J, Combier J-P, Rogers C, Oldroyd G, Frugier F, Niebel A, Gamas P** (2008) EFD Is an ERF Transcription Factor Involved in the Control of Nodule

- Number and Differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**: 2696–2713
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van Den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, et al** (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**: 508
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521 LP-4531
- Voinnet O** (2009) Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* **136**: 669–687
- Wang J, Wang L, Mao Y, Cai W, Xue H, Chen X** (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2204–2216
- Wierzbicki AT, Cocklin R, Mayampurath A, Lister R, Rowley MJ, Gregory BD, Ecker JR, Tang H, Pikaard CS** (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev* **26**: 1825–1836
- Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS** (2008) Noncoding transcription by RNA Polymerase IVb/PolV mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**: 635–648
- Xia R, Meyers BC** (2016) The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *Plant Cell* **29**: 1232–47
- Xia R, Meyers BC, Liu Z, Beers EP, Ye S, Liu Z** (2013) MicroRNA Superfamilies Descended from miR390 and Their Roles in Secondary Small Interfering RNA Biogenesis in Eudicots. *Plant Cell* **25**: 1555–1572
- Xia R, Xu J, Meyers BC** (2017) The Emergence, Evolution, and Diversification of the miR390-TAS3-ARF Pathway in Land Plants. *Plant Cell* **29**: 1232–1247
- Xia R, Ye S, Liu Z, Meyers BC, Liu Z** (2015) Novel and Recently Evolved MicroRNA Clusters Regulate Expansive F-BOX Gene Networks through Phased Small Interfering RNAs in Wild Diploid Strawberry *Plant Physiol.* **169**: 594–610
- Xia R, Zhu H, An Y, Beers EP, Liu Z** (2012) Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biol* **13**: R47
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling T** (2014) Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**: 3517–3528
- Xing D, Li QQ** (2011) Alternative polyadenylation and gene expression regulation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 445–458
- Yan J, Cai X, Luo J, Sato S, Jiang Q, Yang J, Cao X, Hu X, Tabata S, Gresshoff PM, et al** (2010) The REDUCED LEAFLET Genes Encode Key Components of the trans-Acting Small Interfering RNA Pathway and Regulate Compound Leaf and Flower Development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**: 797–807
- Yang L, Wu G, Poethig RS** (2012) Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 315–320
- Yang T, Fang G, He H, Chen J** (2016) Genome-Wide Identification, Evolutionary Analysis and Expression Profiles of LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN Gene Family in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plos One* **11** (8): e0161901
- Yano K, Yoshida S, Muller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, et al** (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20540–20545
- Yifhar T, Pekker I, Peled D, Friedlander G, Pistunov A, Sabban M, Wachsman G, Alvarez JP, Amsellem Z, Eshed Y** (2012) Failure of the tomato trans-acting short interfering RNA program to regulate AUXIN RESPONSE FACTOR3 and ARF4 underlies the wiry leaf syndrome. *Plant Cell* **24**: 3575–3589
- Yoon EK, Yang JH, Lim J, Kim SH, Kim S, Lee WS** (2010) Auxin regulation of the microRNA390-

- dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. **38**: 1382–1391
- Yoshikawa M, Iki T, Tsutsui Y, Miyashita K, Poethig RS, Habu Y, Ishikawa M** (2013) 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 4117–4122
- Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS** (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 2164–2175
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X** (2005) Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science* **307**: 932 LP-935
- Yu X, Willmann MR, Anderson SJ, Gregory BD** (2016) Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role for the Nuclear mRNA Cap-Binding Complex in Cotranslational RNA Decay in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 2385–2397
- Yu Y, Jia T, Chen X** (2017) The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytol* **216**: 1002–1017
- Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M, Aguilar OM** (2010) A C Subunit of the Plant Nuclear Factor NF-Y Required for Rhizobial Infection and Nodule Development Affects Partner Selection in the Common Bean–*Rhizobium etli* Symbiosis. *Plant Cell* **22**: 4142–4157
- Zanetti ME, Chang I-F, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J** (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* **138**: 624–635
- Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, et al** (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–3057
- Zhou C, Han L, Fu C, Wen J, Cheng X, Nakashima J, Ma J, Tang Y, Tan Y, Tadege M, et al** (2013) The Trans-Acting Short Interfering RNA3 Pathway and NO APICAL MERISTEM Antagonistically Regulate Leaf Margin Development and Lateral Organ Separation, as Revealed by Analysis of an argonaute7/lobed leaflet1 Mutant in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **25**: 4845–4862
- Zurcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkerli K, Tarr PT, Muller B** (2013) A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in Planta. *Plant Physiol* **161**: 1066–1075