UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Dinámica citoplasmática de mRNAs como mecanismo de
regulación post-transcripcional de la expresión génica
durante la simbiosis fijadora de nitrógeno***

Tesista: Marcos Lancia

Director: Dr. Flavio Blanco

Codirectora: Dra. María Eugenia Zanetti

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**

***“Dinámica citoplasmática de mRNAs como
mecanismo de regulación post-
transcripcional de la expresión génica
durante la simbiosis fijadora de nitrógeno”***

Tesista: **Lic. Marcos Lancia**
Director: **Dr. Flavio A. Blanco**
Codirectora: **Dra. María Eugenia Zanetti**

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 del Dr. Flavio Antonio Blanco y la codirección de la Dra. María Eugenia Zanetti.

AGRADECIMIENTOS

El título llevará mi nombre, pero realmente esto no podría haber sido posible haciéndolo sólo. Todas las personas que han compartido conmigo parte de este camino tienen su parte de este logro. Arranco de lo macro a lo micro.

Primero agradezco a mi país, por haberme educado desde el colegio primario, hasta mi doctorado. Que este trabajo de varios años nos sirva de recordatorio de que la educación y la cultura del trabajo son las herramientas fundamentales para lograr cualquier objetivo y ser una sociedad un poquito mejor cada día. Por una educación pública, laica, inclusiva y gratuita. Siempre.

A la ciudad de La Plata, que me ha tratado bastante bien durante mi estadía. A la UNLP, la facultad de Cs. Exactas y al IBBM que fueron mi segunda casa por muchos años, y me han abierto sus puertas para alcanzar este logro. A los integrantes del IBBM, los que han estado y los que están. Por haber colaborado cuando fue necesario, dar una mano, y por las amistades que me llevo y las juntadas de becarios. Especial agradecimiento a la gente de Virus Verdes, porque fueron a los que más estuve molestando y/ o manguendo, sobre todo a Facu, Gabo y Edu, y al personal de apoyo, principalmente a Sil, Claudio, Uli y Paulita. Que además de estar para ayudar, me regalaron su amistad.

A Flavio y Eugenia por darme tan grande oportunidad, por dar el ejemplo y enseñarme qué es lo que hay que hacer para ser realmente bueno en esta profesión. A los compañeros del Lab R4 (siempre será R4), que al final del proceso terminan siendo amigos. Vir, Joaco, Mélisse, Efrén, Prixi y Karen que ya andan desperdigados por el mundo. Y a los que aún están, o han vuelto: Caro R., Mauri, Ana Claudia, Sole, Claudio, Cris, Agustín, Mili, Caro G. y a Carla especialmente, gracias por tu aguante y amor incondicional. Gracias a todos por ayudar, por compartir, por charlar, por escuchar, por enseñar, por estar, por querer.

También quiero agradecer a los compañeros de cátedra del turno tarde de los martes de Biología. Vivi, Eze, Boris, Nela, Ivana, Vicky, Luciana. Por ponerle amor, compañerismo y dedicación a la hermosa profesión de enseñar, a pesar de las dificultades.

A los amigos que me regaló la vida, a los hermanos del corazón: a José desde Capital y a Seba y Nahuel desde La Plata. Han hecho que mi familia y mi hogar no queden tan lejos, porque uds mismos también lo son. No me olvido de Fer Suárez. Hemos compartido juntos la aventura de salir de nuestros hogares, y la experiencia fue inmejorable. Mejor compa de depto. no podría haber tenido.

Finalmente quiero agradecer a mi familia. A Martita, Roberto, y a mi hermano Juanpi. Y especialmente a mamá Silvia y papá Enrique, que me han dado todo y lo seguirán haciendo. Gran parte de lo que soy y logré, incluso este título, es gracias a que ellos estuvieron siempre. Su apoyo y compañía se siente en cada paso. Por último, dedicarles este escrito a mis sobrinos, que los amo con el corazón: Emi y Bruno, esto es para uds.

Dejo una frase que leí alguna vez siendo estudiante de grado en un libro de epistemología, y refleja mi pensamiento sobre la ciencia. Me gustó, y la anoté en un papel que siempre llevé conmigo, y por alguna razón nunca quise tirar. Creo que después de 10 años de pasear con él por todos lados, entiendo por qué nunca lo tiré...

“Calificar una cosa de imposible porque su posibilidad actual resulte dudosa, evidencia falta de confianza en el porvenir y es renegar del progreso”

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
INDICE.....	5
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. El nitrógeno y la agricultura.....	13
1.1 Proceso industrial para la obtención de compuestos nitrogenados.....	13
1.2 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	15
2. La familia de las leguminosas y su importancia agronómica	16
2.1 Estudio de la simbiosis fijadora de nitrógeno en las leguminosas <i>Medicago truncatula</i> y <i>P. vulgaris</i>	18
2.2 La asociación simbiótica preferencial establecida entre variedades de <i>P. vulgaris</i> y cepas de <i>Rhizobium etli</i>	20
2.3 Respuestas fisiológicas y morfológicas de las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica con rizobios	23
2.4 Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por rizobios en las raíces de leguminosas.....	25
3. Mecanismos de regulación de la expresión génica	30
3.1 La regulación postranscripcional.....	31
3.2 Regulación citoplasmática de mRNAs	31
3.2.1 Cuerpos de Procesamiento o <i>Processing Bodies</i> (PBs)	34
3.2.1.1 <i>Decapping Protein 1</i> (DCP1) y <i>Exoribonuclease 4</i> (XRN4) como marcadores de PBs	36
3.2.2 Gránulos de estrés o <i>Stress Granules</i> (SGs)	38
3.2.2.1 <i>RNA Binding Protein 47</i> (RBP47) y <i>Oligouridylate Binding Protein 1</i> (UBP1) como marcadores de SGs.....	40
4. Estudios de la dinámica de mRNAs en los diferentes mRNPs a escala genómica.....	43
4.1 Técnica de purificación por afinidad de ribosomas en activa traducción (<i>Translating Ribosome Affinity Purification</i> , TRAP)	47
4.2 Estudios de expresión génica a escala genómica de leguminosas en simbiosis.....	47
4.3 Técnica de inmunoprecipitación de RNPs (<i>RNPs Immuno Precipitation</i> , RIP)	50
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	52
CAPÍTULO I	
Puesta a punto de la técnica de inmunoprecipitación de complejos ribonucleoproteicos citoplasmáticos en <i>M. truncatula</i> : evaluación de genes de la vía de señalización del factor Nod.....	55
1. Búsqueda de secuencias codificantes, clonado y obtención de las construcciones para la sobreexpresión de proteínas de PBs y SGs	56
2. Expresión de las proteínas DCP1 de PBs y de RBP47 de SGs en raíces de <i>M. truncatula</i>	65
3. Análisis fenotípico de las plantas compuestas 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH	66
4. Evaluación de la inducción de genes de nodulación en las plantas compuestas 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH.....	68

5. Visualización de la dinámica de gránulos citoplasmáticos por microscopía confocal	70
6. Inmunopurificación de gránulos citoplasmáticos.....	74
7. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la nodulación sobre muestras RIP de las construcciones 35S:RBP47-FH y 35S:DCP1-FH	78
<i>Discusión Capítulo I</i>	83
CAPÍTULO II	
Análisis de las características de los mRNAs de <i>M. truncatula</i> que cambian su eficiencia traduccional frente a la inoculación con <i>S. meliloti</i>	89
1. El control traduccional y su papel en la regulación de la expresión génica en el contexto de la nodulación	90
2. Análisis de las características de las secuencias de los 5'- UTR, 3'- UTR y CDS de los mRNAs con eficiencia traduccional diferencial en <i>M. truncatula</i> en respuesta a la inoculación con <i>S. meliloti</i>	91
3. Búsqueda de secuencias consenso en los extremos 5'- UTR y 3'- UTR de los mRNAs de genes con eficiencia traduccional diferencial en <i>M. truncatula</i>	99
4. Búsqueda de motivos regulatorios en los extremos UTR de los mRNA de genes involucrados en la vía del NF.....	101
<i>Discusión Capítulo II</i>	107
CAPÍTULO III	
Caracterización de los mRNAs regulados diferencialmente en <i>P. vulgaris</i> en respuesta a diferentes cepas de <i>R. etli</i>	112
1. Análisis de los genes con expresión diferencial.....	113
2. Elementos de regulación asociados a la nodulación eficiente.....	115
3. Análisis de las características de los mRNAs de <i>P. vulgaris</i> expresados diferencialmente en respuesta a distintas cepas de <i>R. etli</i>	123
4. Búsqueda de secuencias consenso en los extremos 5'- UTR y 3'- UTR de los mRNAs de genes de <i>P. vulgaris</i> regulados diferencialmente	129
5. Búsqueda de motivos regulatorios en los extremos UTR de los mRNA de genes regulados diferencialmente.....	133
<i>Discusión Capítulo III</i>	137
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	141
MATERIALES Y MÉTODOS	145
1. Material biológico	146
1.1 Material vegetal.....	146
1.2 Cepas bacterianas	146
1.3 Vectores de clonado.....	146
1.4 Antibióticos.....	147
2. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico	147
2.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico	148
2.2 Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción	148
2.3 Amplificaciones de fragmentos de DNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	148
2.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	149
2.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	150
2.6 Clonado de fragmentos de PCR en pENTR/D-TOPO.....	150
2.7 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)	150
2.8 Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes	151

2.9 Transformación de células DH5α competentes	151
3. Construcción de plásmidos para expresar RBP47, UBP1, DCP1 y XRN4 de <i>M. truncatula</i>	151
3.1 Obtención de construcciones de sobreexpresión mediante el clonado en el vector p35S:FH ...	151
3.2 Obtención de construcciones para la visualización de gránulos citoplasmáticos por microscopía confocal	152
4. Generación de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	153
4.1 Preparación de células de <i>A. rhizogenes</i> ARqua1 electrocompetentes	153
4.2 Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> ARqua1 mediante electroporación	153
4.3 Esterilización y germinación de semillas de <i>M. truncatula</i>	153
4.4 Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> utilizando <i>A. rhizogenes</i> ARqua1	154
5. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas	155
5.1 Inoculación de las raíces de <i>M. truncatula</i> con <i>S. meliloti</i>	155
5.2 Ensayos de nodulación en perlita/arena	156
5.3 Evaluación fenotípica de plantas compuestas	156
6. Técnica para la obtención de mRNPs	156
6.1 Purificación de mRNPs mediante RIP a partir de raíces de <i>M. truncatula</i>	156
7. Métodos para la extracción, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos	158
7.1 Extracción de DNA genómico	158
7.2 Extracción de RNA	159
7.2.1 Extracciones de RNA a partir de tejido de raíz	159
7.2.2 Extracciones de RNA a partir de muestras de inmunopurificaciones de gránulos	159
8. Métodos utilizados para el análisis de proteínas	160
8.1 Preparación de muestras de proteínas	160
8.2 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	160
8.3 Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa	161
9. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcritos	161
9.1 Tratamiento con DNAsa	161
9.2 Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa	162
9.3 Ensayos de qPCR	162
9.4 Análisis y normalización de los datos de qPCR	162
10. Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizados para el análisis de secuencias	163
10.1 Herramientas bioinformáticas	163
10.2 Bases de datos de secuencias	164
10.3 Análisis bioinformáticos	164
11. Secuencias de primers	165
12. Microscopía confocal	166
12.1 Generación de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 electrocompetentes	167
12.2 Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 mediante electroporación	167
12.3 Ensayos de localización subcelular por fluorescencia en <i>N. benthamiana</i>	166
BIBLIOGRAFIA	169
ANEXO I	182
Secuenciaciones de las construcciones utilizadas para la transformación de raíces de <i>M. truncatula</i>	183
ANEXO II	186
Tabla A	187
Tabla B	187
Tabla C	187
Tabla D	187

ANEXO III	188
Tabla A.....	189
Tabla B	189
Tabla C	189
Tabla D.....	189
Tabla E.....	189
Tabla F.....	189
Tabla G.....	189
Tabla H.....	189

ABREVIATURAS

ACT11 (<i>actina 11</i>)	Mt (<i>Millones de toneladas</i>)
AFLP (<i>amplified fragment lenght polimorfism</i>)	ncRNA (<i>non coding RNA</i>)
AFLPs : Amplified Fragment Length Polymorphism	NF (<i>Nod factor</i>)
AGO (<i>argonauta</i>)	NFP (<i>Nod Factor Perception</i>)
ARFLP (<i>amplified restriction fragment lenght polimorfism</i>)	NFR (<i>Nod factor receptor</i>)
bHLH (<i>factores de transcripción del tipo basic Helix loop helix</i>)	NFs (<i>Nod Factors</i>)
CaMV 35S (<i>promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor</i>)	NF-Y (<i>Nuclear factor Y</i>)
Cap (<i>5' m7GpppN</i>)	NIN (<i>Nodule inception</i>)
CCaMK (<i>calcium and calmodulin-binding kinase</i>)	NMD (<i>nonsense mediated decay</i>)
cDNA (<i>ácido desoxirribonucleico copia</i>)	NSP (<i>Nodulation signaling pathway</i>)
CDS (<i>coding sequence</i>)	nts (<i>nucleótidos</i>)
CNGC15 (<i>cyclic nucleotide - gated channel 15</i>)	NUP (<i>nucleoporina</i>)
CRE (<i>cytokin response element</i>)	ocs (<i>octopina sintasa</i>)
Ct (<i>ciclo de detección umbral de qPCR</i>)	ORF (<i>open reading frame</i>)
CYC (<i>cyclin</i>)	p35S (<i>Cauliflower mosaic virus 35S promoter</i>)
DCP (<i>decapping protein</i>)	PABP (<i>poly (A) binding protein</i>)
DMI (<i>Doesn't make infections</i>)	PAS (<i>poly adenylation site</i>)
DNA (<i>ácido desoxirribonucleico</i>)	pb (<i>pares de bases</i>)
DOxxx (<i>Densidad Óptica medida con una longitud de onda de xxx nm</i>)	PBs (<i>processing bodies</i>)
dpi (<i>días post inoculación</i>)	PBS-T (<i>buffer fosfato salino con Tween 0,05%</i>)
DTT (<i>ditiotreitól</i>)	PCR (<i>reacción en cadena de la polimerasa</i>)
EDTA (<i>ácido etilendiamino tetra-acético</i>)	pre-mRNA (<i>precursor de mRNA</i>)
EGTA (<i>ácido etilen glicol bis (β-aminoetil-éter)-N, N', N', tetraacético</i>)	PrLD (<i>prion- like domains</i>)
eIF (<i>eukaryotic initiation factor</i>)	RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
EIN3 (<i>Ethylene insensitive 3 family protein</i>)	RB (<i>borde derecho del T-DNA</i>)
ENODs (<i>Early Nodulin</i>)	RBP (<i>RNA binding protein</i>)
ERF (<i>Ethylene responsive factor</i>)	RIP (<i>RNA immunopurification</i>)
ERN (<i>Ethylene Response Factor Required for Nodulation</i>)	RLK (<i>receptor like kinase</i>)
ET (<i>eficiencia traduccional</i>)	RNA (<i>ácido ribonucleico</i>)
FBN (<i>Fijación Biológica de Nitrogeno</i>)	RNAi (<i>RNA de interferencia</i>)
FC (<i>fold change- tasa de cambio</i>)	RNA-seq (<i>secuenciación masiva de RNA</i>)
FLAG (<i>péptido DYKDDDDK</i>)	RNP (<i>ribo nucleo protein</i>)
FPKM (<i>Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i>)	rpm (<i>revoluciones por minuto</i>)
GAT (<i>cassette de gateway</i>)	RR (<i>reguladores de respuesta a citoquinas</i>)
GDP (<i>guanosina difosfato</i>)	RRM (<i>RNA recognition motif</i>)
GED (<i>genes con expresión diferencial</i>)	RT- qPCR (<i>Real Time - reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa</i>)
GFP (<i>green fluorescent protein</i>)	RT : transcripción reversa
GTP (<i>guanosina trifosfato</i>)	SDS (<i>dodecil sulfato de sodio</i>)
HF (<i>epitope His-FLAG</i>)	seg (<i>segundos</i>)
His (H) (<i>histidina y epitope de histidinas</i>)	

HIS3L (<i>histona3</i>)	SEM (<i>standard error of the mean</i>)
hpi (<i>horas post inoculación</i>)	SGs (<i>stress granules</i>)
HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)	SIN1 (<i>Scarecrow-like 1 Involved in Nodulation</i>)
hs (<i>horas</i>)	siRNA (<i>small interference RNA</i>)
IP (<i>infection pocket</i>)	snRNA (<i>small nuclear RNA</i>)
IPD3 (<i>interacting protein of dmi3</i>)	sRNA (<i>small RNA</i>)
IRES (<i>inner ribosome entry site</i>)	SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
IT (<i>infection thread</i>)	SYMRK (<i>Symbiosis Receptor Kinase</i>)
Kb (<i>kilopares de bases</i>)	TBE (<i>TRIS buffer EDTA</i>)
kDa (<i>kilo Daltons</i>)	TBS (<i>TRIS buffer salino</i>)
LB (<i>borde izquierdo del T-DNA</i>)	T-DNA (<i>DNA de transferencia de la planta</i>)
LB (<i>medio de cultivo Luri</i>)	TEMED (<i>N`-N`-N`-N` tetrametiletildiamina</i>)
LIN (<i>lumpy infection</i>)	TF (<i>factor de transcripción</i>)
lncRNA (<i>long noncoding RNA</i>)	Tm (<i>temperatura de melting</i>)
LRR (<i>Leucine rich repeat</i>)	TRAP (<i>Translating Ribosome Affinity Purification</i>)
LYK3 (<i>LysM domain receptor-like kinase 3</i>)	UBP (<i>ubiquitin binding protein</i>)
LysM (<i>lysin motif</i>)	uORF (<i>marco abierto de lectura previo al ORF principal</i>)
mg (<i>miligramo</i>)	UTR (<i>untranslated region</i>)
miRNA (<i>micro RNA</i>)	UV (<i>luz ultravioleta</i>)
ml (<i>mililitros</i>)	VCS (<i>varicose</i>)
MLD (<i>malectin-like domain</i>)	WB (<i>buffer de lavado</i>)
mM (<i>milimolar</i>)	wt (<i>wild type</i>)
Mock (<i>inoculación con agua</i>)	xg (<i>veces de gravedad</i>)
MOPS (<i>ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfónico ácido 4-(N-Morfolino)propanosulfónico</i>)	XRN (<i>exorribonucleasa</i>)
mRNA (<i>RNA mensajero</i>)	YEM (<i>Yeast Extract Mannitol</i>)
mRNP (<i>ribo nucleo protein messengers</i>)	YFP (<i>yellow fluorescent protein</i>)

RESUMEN

La disponibilidad de nitrógeno es uno de los factores más importantes que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas. La interacción simbiótica entre leguminosas y bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno pertenecientes a la familia Rhizobiaceae resulta en la formación de un nuevo órgano, denominado nódulo, donde la bacteria fija el nitrógeno atmosférico (FBN) a formas reducidas que pueden ser incorporadas al metabolismo de la planta. El establecimiento de la simbiosis requiere una reprogramación de la expresión génica de las células de la raíz que involucra cambios a nivel transcripcional y postranscripcional. Dentro de estos últimos se encuentra la distribución dinámica de los mRNAs en distintos complejos ribonucleoproteicos (RNPs) citoplasmáticos, principalmente los polisomas, los cuerpos de procesamiento (*P-bodies* o PBs) y los gránulos de estrés (*Stress Granules* o SGs). En esta tesis doctoral se desarrolló una técnica de purificación de complejos RNPs en la planta leguminosa *M. truncatula*, que permita caracterizar el movimiento de RNAs entre los diferentes complejos RNP citoplasmáticos durante la simbiosis. La expresión de las proteínas DCP1 y RBP47 fusionadas al tag FLAG permitió co-inmunopurificar el RNA asociado a PBs y SGs, respectivamente. La cuantificación de mRNAs de genes involucrados en la vía de señalización del *Nod Factor* (NF) mostró que existe una regulación postranscripcional de los genes de la vía del NF en *M. truncatula* que depende de la movilización dinámica de RNAs entre los polisomas, los SGs y los PBs. Por otra parte, la expresión de las fusiones RBP47-RFP y DCP1-YFP permitieron visualizar la dinámica y colocalización de los RNPs *in vivo* en tejido foliar de *N. benthamiana* y de raíces de *M. truncatula*. En el segundo capítulo, se analizaron las características de los mRNAs que presentaban un cambio en la eficiencia traduccional en respuesta a la inoculación con rizobios. La longitud de los mRNAs, el contenido GC, y la estructura secundaria, tanto de sus secuencias no traducidas como de las codificantes, están correlacionadas con la eficiencia traduccional, sugiriendo que estos parámetros influyen en la asociación de los transcritos a los polisomas en el contexto de la reprogramación génica y la modulación de su traducción durante la simbiosis. En el tercer capítulo, se muestra que las redes transcripcionales que operan en la simbiosis son diferentes a las que participan en la selección de aquellas cepas más eficientes en la simbiosis. Estas diferencias involucran elementos de regulación que actúan tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han arrojado luz sobre la dinámica citoplasmática de los mRNAs y han permitido caracterizar los elementos regulatorios del DNA y del RNA asociados a la simbiosis fijadora de nitrógeno, sentando las bases para futuros proyectos de investigación y desarrollo que permitan optimizar la fijación de nitrógeno en leguminosas de interés agronómico.

Introducción

1. El nitrógeno y la agricultura

El nitrógeno es un elemento esencial para todos los seres vivos ya que es requerido para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y vitaminas. A pesar de que el 78% de la atmósfera está compuesta por nitrógeno molecular (N_2), sólo ciertas bacterias, cianobacterias, algas cianofíceas y actinomicetos pueden incorporarlo directamente a su metabolismo (Howarth et al., 2002). El resto de los microorganismos, plantas y animales dependen de otras fuentes de nitrógeno combinado como fuente de nitrógeno.

En los sistemas agrícolas, la disponibilidad de fuentes asimilables de nitrógeno y fósforo en los suelos suele ser un factor limitante del crecimiento vegetal, y en consecuencia de su productividad (Smil, 1999). Para suplir esta deficiencia, durante siglos se recurrió al uso de fertilizantes de origen natural como el guano y el salitre (Galloway et al., 2013). Sin embargo, la generación de estos productos no alcanzaba a cubrir la demanda, y su adición a la cadena productiva encarecía el producto final.

1.1 Proceso industrial para la obtención de compuestos nitrogenados

A comienzos del siglo XX el químico alemán Fritz Haber desarrolló la síntesis de amonio a partir de hidrógeno y nitrógeno, y posteriormente Carl Bosch logró llevar el desarrollo de Haber a escala industrial mediante la química de alta presión (Leigh, 2004) (Fig. 1).

Figura 1. Proceso Haber para la obtención de amoníaco. El proceso de Haber permite la síntesis de amoníaco (NH_3) a partir de nitrógeno (N_2) e hidrógeno (H_2) molecular. La reacción de síntesis requiere un gran aporte de energía; 600 °C de temperatura y una presión de 200 atmósferas (atm).

Gracias a este proceso, la producción de fertilizantes nitrogenados a nivel industrial ha ido en aumento. Se estima que anualmente se fijan 120 millones de toneladas (Mt) de nitrógeno mediante el proceso de Haber y Bosch, mientras que la fijación de nitrógeno por fuentes naturales es de sólo 63 Mt anuales (Fowler et al., 2013).

La disponibilidad de fertilizantes químicos permitió suplir la deficiencia de nitrógeno de los suelos y reponerlo en cada siembra, aumentando fuertemente el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la utilización indiscriminada de fertilizantes trae consigo graves problemas ambientales y socio-económicos. Sólo una fracción del amonio (NH_4^+) de los fertilizantes es incorporado por las plantas, mientras que el resto es convertido en distintos compuestos nitrogenados (Fowler et al., 2013). Una porción del nitrógeno retorna a la atmósfera en forma de óxido nitroso (N_2O), un gas que contribuye al efecto invernadero. También se generan distintos óxidos de nitrógeno que generan lluvia ácida, afectando la calidad y productividad de los suelos (Galloway et al., 2008). Además, los microorganismos nitrificantes convierten el amonio en nitratos (NO_3^-) o nitritos (NO_2^-), los cuales lixivian hacia las napas y cursos de agua provocando su contaminación y la eutrofización de sus sumideros (Gruber and Galloway, 2008). Durante este proceso, se produce una gran proliferación de algas y plantas en la superficie del agua que disminuye la cantidad de la luz solar que alcanza el lecho, impidiendo que microorganismos autótrofos pelágicos lleven a cabo la fotosíntesis que permite la oxigenación del agua. Esto trae consigo un grave daño ecológico, un fuerte impacto en los ecosistemas, y una gran pérdida de biodiversidad (Erisman et al., 2013).

Sumado a los daños medioambientales, el uso descontrolado de fertilizantes también genera problemas sociales y económicos. La producción industrial de fertilizantes es un proceso no sustentable que requiere la utilización de grandes cantidades de energía para alcanzar las altas presiones y temperaturas requeridas para acelerar la reacción de síntesis de amonio a partir de nitrógeno e hidrógeno molecular. Además, los nitratos/nitritos presentes en el agua de consumo convierten la hemoglobina de la sangre en metahemoglobina, la cual reduce la cantidad de oxígeno que se transporta en la sangre. También hay evidencias de la aparición de nitrosaminas en el aparato digestivo humano, que proceden de la reacción de los nitratos y nitritos ingeridos con aminos incorporadas a partir de la dieta, y cuyo carácter cancerígeno fue puesto de manifiesto por Magee and Barnes (1956).

Actualmente se estima que la población mundial es de aproximadamente 7.400 millones de personas, y las proyecciones indican que continuará creciendo de manera exponencial en los próximos años (Gerland et al., 2014). Uno de los grandes desafíos de

la ciencia, y en particular de la biotecnología, es cómo generar la cantidad de alimento suficiente para una población humana en aumento, de una manera sustentable sin comprometer la calidad del suelo (Tilman et al., 2002). En este contexto, la **Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)** surge como una alternativa promisorio, principalmente por su bajo costo de implementación y la sustentabilidad del proceso (Duhamel and Vandenkoornhuyse, 2013).

1.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN, llevada a cabo por procariotas, consiste en la reducción de nitrógeno gaseoso (N_2) en amoníaco (NH_3^+). Estos organismos procariotas son denominados diazótrofos (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación) y utilizan el complejo enzimático nitrogenasa para catalizar la siguiente reacción:

La estequiometría de la reacción muestra un alto consumo de energía en la forma de ATP y equivalentes de reducción. Además, el complejo nitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por lo que la reducción de N_2 mediante la FBN debe realizarse en un ambiente anaerobio o microaerobio (Zumft and Mortenson, 1975).

Los diazótrofos pueden reducir el N_2 como organismos de vida libre o en simbiosis con plantas. Dicha simbiosis puede llevarse a cabo entre plantas y cianobacterias, la cual está ampliamente distribuida, o llevada a cabo en órganos especializados de raíces denominados *nódulos*, la cual se encuentra restringida a las familias de plantas *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 bacterias gram-negativas del género *Rhizobium* (Delaux et al., 2015).

El uso agronómico de la FBN es una alternativa sustentable al uso de fertilizantes nitrogenados, y una forma de disminuir su utilización y consecuente impacto ambiental. Además de proveer una fertilización natural a los suelos, el crecimiento de leguminosas en la rotación de cultivos promueve la diversidad y reduce significativamente las poblaciones de patógenos vegetales (Brockwell et al., 1995). 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 en zonas áridas (Graham and Vance, 2003). Por otra parte, aproximadamente el 33% de las necesidades nutricionales de nitrógeno en las dietas humanas provienen de las leguminosas de grano, siendo la base proteica de la dieta de numerosos países en vías de desarrollo (Graham and Vance, 2003).

2. La familia de las leguminosas y su importancia agronómica

La familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, comúnmente llamadas leguminosas, incluye árboles, arbustos y plantas herbáceas que pueden identificarse por su fruto tipo legumbre, nombre con que se designan a las semillas encerradas en una vaina. Son la tercer gran familia de plantas superiores con aproximadamente 730 géneros y más de 18.000 especies (Hofer and Noel Ellis, 2014). Como se mencionó anteriormente, una característica de esta familia es que la mayoría de las Fabáceas establecen una relación simbiótica con bacterias del suelo denominadas rizobios, capaces de fijar N_2 atmosférico en formas asimilables por la planta (NO_3^- o NH_4^+) dentro de los nódulos, a cambio de fotosintatos aportados por la planta hospedante. Algunas de las especies de leguminosas de importancia agronómica incluyen *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (poroto), *Pisum sativum* (arveja), *Cicer arietinum* (garbanzo), *Medicago sativa* (alfalfa) y *Arachis hypogaea* (maní) (**Fig. 2**).

Figura 2. Fotografías representativas de las hojas, flores y frutos/semillas de las leguminosas alfalfa (*Medicago sativa*), arveja (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), maní (*Arachis hypogaea*), poroto (*Phaseolus vulgaris*) y soja (*Glycine max*).

El área utilizada a nivel mundial para la siembra de leguminosas de grano y forrajeras es de aproximadamente 184 millones de hectáreas (Ha), correspondientes a un 11 % de la superficie de la tierra útil para la agricultura (Vance et al., 2000). Las leguminosas son indispensables para el desarrollo de sistemas de agricultura sustentable, porque preservan la integridad de los ecosistemas y representan un valor económico y social importante para aquellas regiones dedicadas a la producción de leguminosas.

2.1 Estudio de la simbiosis fijadora de nitrógeno en las leguminosas *Medicago truncatula* y *P. vulgaris*

La especie *M. truncatula* fue seleccionada como especie modelo por su fácil manipulación en el laboratorio. Tiene un ciclo de vida corto (3-4 meses), alta producción de semillas, genoma pequeño, diploide y disponibilidad de métodos de transformación genética (Cook, 1999). *M. truncatula* es representativa de las leguminosas de climas templados, puede reproducirse por autofertilización o por cruzamientos y su genoma se encuentra disponible en bases de datos (Young et al., 2012). Si bien comparte muchas características con otra especie modelo como *Lotus japonicus*, estas especies producen diferentes tipos de nódulos; *M. truncatula*, al igual que otras leguminosas típicas de climas templados como alfalfa y arveja, genera nódulos indeterminados, mientras que *Lotus japonicus*, *G. max* y *P. vulgaris*, de climas cálidos, pertenecen al grupo de leguminosas que desarrollan nódulos determinados. Los nódulos indeterminados se caracterizan por poseer una forma cilíndrica, con un meristema persistente que continuamente genera nuevas células, y zonas de diferenciación bien definidas a lo largo del eje longitudinal del nódulo. Los nódulos determinados son esféricos, desarrollan un meristema transitorio y luego el nódulo crece por crecimiento celular en lugar de división celular. En los nódulos determinados todas las células se encuentran en el mismo estadio de diferenciación (**Fig. 3**).

Figura 3. Esquema de nódulos determinados e indeterminados. Las leguminosas de climas templados, como *M. truncatula*, generan nódulos indeterminados, mientras que las de clima cálido, como *L. japonicus* o *P. vulgaris*, generan nódulos determinados. Los nódulos indeterminados presentan un meristema persistente y forma alargada, mientras que los nódulos determinados no presentan meristema persistente y tienen forma esférica. El meristema persistente en los nódulos indeterminados es originado a partir de la tercera capa celular del córtex, mientras que algunas capas de la base del nódulo se originan de la división de células del córtex interno, periciclo y endodermis (Xiao et al., 2014). Los nódulos de tipo determinado se originan a partir de unas pocas divisiones celulares del córtex externo, y pierden su meristema en estadios tempranos del desarrollo (Ferguson et al., 2010; Xiao et al., 2014). **A.** Esquema de nódulo determinado, donde la zona central (**S**) es de senescencia de los bacteroides; alrededor de la zona **S** se encuentra la zona de fijación de nitrógeno (**ZF**). **B.** Esquema de un nódulo indeterminado, el cual presenta 5 zonas diferenciadas. La zona **I** es la zona meristemática, donde se generan nuevas células para los tejidos del nódulo en crecimiento; la zona **II**, donde penetran los hilos de infección (IT); Una interzona **II- III**; la zona **III** de fijación; la zona **IV** de senescencia, y la zona **V** saprofítica. Las zonas **II – V** representan etapas de diferenciación del tejido que contiene bacteroides. Este tejido está rodeado de capas corticales: córtex externo parenquimatoso de células no especializadas, endodermis cortical, que es una monocapa de células lignificadas que, junto con células especializadas ubicadas dentro de la corteza interna, contribuyen a mantener las condiciones microoxicas necesarias para la actividad de la nitrogenasa. La endodermis cortical es continua con la endodermis de la raíz. El sistema vascular del nódulo consiste en haces vasculares localizados en la corteza interna que se bifurcan desde una traza vascular, que conecta el nódulo con los tejidos vasculares de la raíz.

Considerando las ventajas y aplicaciones de las plantas leguminosas en la agricultura ya mencionadas, se han generado diversas herramientas para el estudio de las bases moleculares implicadas en el proceso de simbiosis. Las herramientas de genética directa desarrolladas para los análisis funcionales en *M. truncatula* incluyen colecciones de mutantes obtenidas por tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS) o rayos γ (Jemalong, 1995; Sagan et al., 1995). Además, se generaron poblaciones de mutantes insercionales con transposones *Tnt-1* (D'Erfurth et al., 2003; Tadege et al., 2008; Pislariu et al., 2012) y varios métodos de transformación genética. Uno de estos métodos de transformación permite la generación de plantas transgénicas estables mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* (Trieu and Harrison, 1996; De Araújo et al., 2004). Otro de los métodos desarrollados consiste en la generación de plantas compuestas que consisten en una parte aérea salvaje y raíces transgénicas. En este método de transformación se utiliza la bacteria *A. rhizogenes*, la cual genera raíces muy ramificadas conocidas en inglés como *hairy roots* (Boisson-Dernier et al., 2001). Asimismo, se han creado bases de datos de expresión a partir de hibridaciones de microarreglos de Affymetrix y datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) realizados con tejido de *M. truncatula* correspondiente a distintos órganos y distintas condiciones bióticas (Benedito et al., 2008; He et al., 2009; Boscari et al., 2012; Donà et

al., 2013; Roux et al., 2014). Estas técnicas y herramientas permitieron identificar un gran número de genes requeridos para la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Por su parte, *P. vulgaris*, es un importante cultivo agronómico y modelo de investigación. Se han descrito aproximadamente 50 especies del género *Phaseolus*, siendo *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*, y *P. lunatus* las especies con mayor impacto agronómico (Martínez-Romero, 2003). Debido a su alto valor nutricional, el grano es utilizado como complemento de las dietas ricas en hidratos de carbono, siendo África y América Latina los principales consumidores (Broughton et al., 2003). Una característica de este cultivo es su versatilidad, pudiéndose adaptar a diversas condiciones climáticas y regiones, siendo preferentes las regiones templadas o tropicales. El período vegetativo puede variar entre 70 a 200 días, permitiéndole actuar como un excelente cultivo rotativo, o como una fuente continua de semillas para alimento. En conjunto, la diversidad del sistema de producción que ofrece el poroto y sus propiedades nutritivas lo distingue de otros cultivos de grano. En cuanto a las herramientas genéticas desarrolladas en *P. vulgaris*, se destacan la secuenciación completa de una variedad andina y una mesoamericana (Vlasova et al., 2016; Schmutz et al., 2014), la disponibilidad de datos de expresión obtenidos mediante RNA-seq (Dalla Via et al., 2015; O'Rourke et al., 2014), además de disponer de un eficiente método para generar raíces transgénicas utilizando *A. rhizogenes* (Estrada-Navarrete et al., 2006).

2.2 La asociación simbiótica preferencial establecida entre variedades de *P. vulgaris* y cepas de *Rhizobium etli*

Análisis filogenéticos sugieren que *P. vulgaris* surgió en América hace aproximadamente 4 millones de años (Delgado-Salinas et al., 2006); sin embargo aún se debate acerca de la región geográfica exacta donde esto ha ocurrido. Estudios recientes basados en análisis genómicos proponen a la región Mesoamericana como el centro de origen de *P. vulgaris* (norte de México hasta Colombia), a partir del cual ocurrió una radiación de la población hacia la región Andina hace aproximadamente 165.000 años (Ecuador, Bolivia, Perú y noroeste Argentino), generando dos *pooles* genéticos aislados geográfica y genéticamente (Bitocchi et al., 2012; Schmutz et al., 2014; Rendón-Anaya et al., 2017). A partir de estos *pooles* genéticos silvestres, hace aproximadamente 8.000

años, *P. vulgaris* fue domesticado de manera independiente en el territorio que hoy es ocupado por México y en la región Andina de Sudamérica (Bitocchi et al., 2013; Gepts et al., 1986; Mamidi et al., 2013) (**Fig. 4**).

Figura 4. Esquema geográfico de los centros de diversificación genética de *P. vulgaris* y la correlación con la distribución de cepas de *R. etli*. *P. vulgaris* se ha diversificado en dos centros genéticos aislados, la región Mesoamericana (México, centro América, Colombia), y la Andina (Ecuador, Bolivia, Noroeste de Argentina). Los cultivares de origen Mesoamericano y Andino establecen una asociación simbiótica preferencial y más eficiente con cepas de *R. etli* portadoras del polimorfismo en el gen *nodC* de tipo α y δ , respectivamente. El polimorfismo fue analizado por PCR seguido de restricción enzimática con *HinfI* (izquierda) (Aguilar et al., 2004). Los colores rojos del mapa indican la cantidad de especies de *P. vulgaris* actuales. Figura adaptada a partir de Bitocchi et al (2017), y datos publicados en Aguilar y colaboradores (2004).

Cada una de las variedades de los centros de diversificación posee características distintivas, como el tamaño y color de las semillas, morfología de la planta, diferencias en los tipos de faseolina (proteína de semilla) y alelos de microsatélites (Gepts et al., 1986; Singh et al., 1991). La historia evolutiva de la especie ha sido inferida a partir del uso de marcadores moleculares, tales como *Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism* (ARFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) y *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Gepts and Bliss, 1988; Singh et al., 1991; Velasquez and Gepts, 2008; Tohme et al., 1996; Gept, 1998; Papa and Gepts, 2003; Blair et al., 2006; Díaz and Blair, 2006). Asimismo, el estudio de los

polimorfismos en bacterias aisladas de nódulos de *P. vulgaris* han permitido identificar la asociación simbiótica con *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. giardinii*, *R. gallicum* y algunos rizobios simbioses de leguminosas tropicales como *R. fredii* y *R. meliloti* (Hernandez-Lucas, 1995). Sin embargo, *R. etli* es la especie de rizobio predominantemente asociada a las variedades de *P. vulgaris* tanto silvestres como domesticadas (Aguilar et al., 2001, 1998; Laguerre et al., 2001).

El estudio de las poblaciones de *R. etli* basado en el polimorfismo del gen *nodC*, realizado mediante la técnica de ARFLP, permitió determinar que las poblaciones de *R. etli* presentes en suelos del centro de diversificación Mesoamericano y del centro Andino son diferentes (**Fig. 4**). En suelos Mesoamericanos predominan las cepas con el polimorfismo del gen *nodC* tipo α (en adelante, cepas tipo $-\alpha$), mientras que en suelos Andinos predominan cepas que portan el alelo *nodC* tipo δ (cepas tipo $-\delta$), lo que se correlaciona con el tipo de alelo presente en los microsimbiontes aislados de nódulos de cultivares de cada centro de diversificación (Aguilar et al., 2004). Sumado a esto, las variedades Mesoamericanas desarrollan una mayor cantidad de nódulos cuando son inoculadas con cepas tipo *nodC*- α que con cepas tipo *nodC*- δ , mientras que en las variedades Andinas ocurre el fenómeno inverso (Peltzer Meschini et al., 2008). Estos datos sugieren fuertemente que planta y bacteria han co-evolucionado de manera independiente en cada centro de diversificación, desarrollando mecanismos de reconocimiento mutuo. Más aún, en experimentos de co-inoculación con cepas tipo $-\alpha$ y $-\delta$, las variedades Mesoamericanas nodulan casi exclusivamente con cepas tipo $-\alpha$ (Aguilar et al., 2004). En nuestro laboratorio se ha indagado en los aspectos moleculares de este reconocimiento planta-rizobio, y se han identificado genes de la planta implicados en la asociación de esta especie con rizobios altamente eficientes (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010; Mazziotta et al., 2013; Rípodas et al., 2013, Dalla vía et al., 2015; Ripodas et al., 2019).

La gran biodiversidad de variedades silvestres y domesticadas de *P. vulgaris* y su coevolución con cepas de *R. etli* de manera independiente en los distintos centros de diversificación genética ponen a este sistema biológico en una posición de gran interés científico para la investigación de la especificidad y la co-evolución de la simbiosis (Aguilar et al., 2004). En línea con este interés, en los últimos años se ha generado una gran cantidad de información genómica y transcriptómica de variedades

correspondientes a cada uno de los *pooles* génicos. Actualmente se encuentra disponible la secuencia genómica de cultivares Andinos (Schmutz et al., 2014) y Mesoamericanos (Vlasova et al., 2016), como así también un atlas de la expresión génica (O'Rourke et al., 2014).

2.3 Respuestas fisiológicas y morfológicas de las raíces de leguminosas durante la asociación simbiótica con rizobios

Cuando las plantas leguminosas se encuentran en condiciones de deficiencia de nitrógeno, exudan flavonoides e isoflavonoides a través de sus raíces, los cuales son percibidos por el rizobio activando el factor de transcripción bacteriano NodD (Perret et al., 2000). El factor de transcripción NodD activa la expresión de los genes que llevan a cabo la síntesis de otro tipo de moléculas de señalización denominados factores de nodulación (**Nod Factor, NF**) (Debellé et al., 1996; Denarie and Debellé, 2002). Los NFs son señales difusibles que activan diversos procesos de desarrollo en la planta. El NF presenta una estructura básica de un esqueleto de 2 a 5 residuos de *N*-acetil-glucosaminas, con un ácido graso en el extremo no reductor. Esta estructura básica del NF está presente en todas las especies de rizobios (Horvath et al., 1987), y puede sufrir modificaciones posteriores. Las diferentes modificaciones adicionales a la estructura básica del NF, junto con la longitud y el grado de saturación del ácido graso, son características de cada especie de rizobio, y son determinantes en la especificidad de la interacción entre la planta hospedadora y las especies de rizobios compatibles (Lerouge et al., 1990; Debellé et al., 1996; Denarie and Debellé, 2002).

La percepción de los NF es suficiente para iniciar la organogénesis del nódulo y los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar durante la infección rizobiana, procesos que están altamente coordinados, a pesar de que se dan en diferentes capas celulares de la raíz de las plantas (Geurts et al., 2012; Oldroyd et al., 2011). La percepción de los NF comienza en la superficie del pelo radical, donde se produce la adhesión del rizobio mediada por lectinas de la planta (Dazzo et al., 1984; Radutoiu et al., 2003) (**Fig. 5A**). Esto altera el crecimiento del pelo radical y como consecuencia se inicia un nuevo eje de crecimiento (van Batenburg et al., 1986). Este cambio genera la curvatura del pelo que rodea entre sus paredes celulares a la bacteria adherida, en una estructura denominada bolsillo de infección (**Infection Pocket, IP**) (Hari and Bisseling, 1998) (**Fig.**

5B). Los rizobios allí atrapados comienzan a dividirse generando un foco de infección, que eventualmente dará lugar a la formación del hilo de infección (*Infection Thread, IT*).

Figura 5. Etapas iniciales de la infección por rizobios. Los procesos de infección del rizobio y morfogénesis del nódulo ocurren coordinadamente y son regulados por el Factor Nod (NF) (A). En respuesta al NF secretado por el rizobio, el pelo radical reorienta su eje de crecimiento para formar un rulo donde la bacteria queda atrapada y forma una microcolonia, en el denominado bolsillo de infección (IP) (B). Para que la infección continúe, es necesaria una degradación localizada de la pared celular y la formación del hilo de infección (IT), un canal que guía a las bacterias hacia las células internas de la raíz (C). Paralelamente, ocurren las primeras divisiones celulares corticales [capas 4 y 5 del córtex interno (C4 y C5) en nódulos indeterminados]. A medida que la infección progresa a partir del desarrollo del IT, el rizobio continúa dividiéndose dentro del IT y produciendo NF. Al mismo tiempo, continúa la división celular de las capas internas del córtex, C3, C4, C5, además de divisiones celulares de endodermis (En) y periciclo (Pc). En su avance, el IT se ramifica y finalmente alcanza el primordio nodular, donde se produce la liberación de los rizobios y la invasión de las células del primordio de nódulo (D).

El crecimiento del IT implica la invaginación de la pared celular en conjunto con la extensión de la membrana plasmática, generando una estructura transcelular, en la cual la bacteria se divide en forma monoclonal inmersa en una matriz de glicoproteínas (Miwa et al., 2006; Jones et al., 2007). El IT se extiende a través del pelo radical y la dirección de crecimiento es determinada por la migración del núcleo, conectada al extremo del IT mediante filamentos de actina y microtúbulos (Timmers et al., 1999; Arrighi et al., 2008; Fournier et al., 2008; Gage, 2017). Simultáneamente, las células corticales se dividen y desarrollan pre-hilos de infección (*PIT*) (Fig. 5C), anticipando la

dirección de crecimiento. El IT se elonga fusionándose a estos PIT y finalmente llegan al primordio del nódulo (**Fig. 5D**). Las bacterias son liberadas en las células corticales, donde quedan rodeadas de una membrana derivada de la planta formando estructuras denominadas *simbiosomas*, donde se diferencian a bacteroides. Los simbiosomas en nódulos indeterminados contienen un bacteroide que lleva a cabo la endoreduplicación de su genoma, generando alrededor de 24 cromosomas, en contraste con uno o dos de la bacteria de vida libre. La diferenciación del bacteroide es irreversible, por lo que se cree que son incapaces de retornar a la vida libre (Mergaert et al., 2006). Por el contrario, en nódulos determinados, los simbiosomas contienen dos o más bacteroides que mantienen el número de cromosomas en uno o dos, de manera similar a la bacteria en estado saprofítico. En este caso, la diferenciación de los bacteroides es reversible, por lo que pueden volver a la vida libre (Oldroyd et al., 2011). Finalmente, es en los simbiosomas donde ocurre la fijación del nitrógeno atmosférico catalizada por el complejo nitrogenasa. Esta reacción ocurre en bajas concentraciones de oxígeno (Brussel et al., 1992) utilizando dicarboxilatos generados por la planta como fuente de energía, tanto en nódulos determinados como indeterminados (Oldroyd et al., 2011).

2.4 Vías de señalización y respuestas moleculares activadas por rizobios en las raíces de leguminosas

En los últimos 20 años se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el reconocimiento de los NFs por parte de la planta y de las vías de señalización en las células de la raíz luego de dicho reconocimiento. Estos avances fueron posibles principalmente gracias a *screenings* de plantas mutantes con pérdida o ganancia de función en la nodulación, principalmente en las especies modelo *L. japonicus* y *M. truncatula*. La vía de señalización y los componentes de la misma descritos hasta el momento para *M. truncatula* se ilustran en la **Figura 6**.

Los NFs son reconocidos por receptores de membrana de tipo Serina/Treonina quinasa con dominios extracelulares LysM (**LysM Motif**), los cuales fueron denominados NFP (**Nod Factor Perception**) y LYK3 (**LysM receptor like Kinase 3**) en *M. truncatula* (Arrighi, 2006; Limpens et al., 2003). Mutantes de pérdida de función en *NFP* y *LYK3* son incapaces de formar nódulos y no presentan las respuestas tempranas típicas al NF

como la deformación del pelo radical y la formación de hilos de infección (Arrighi, 2006; Smit et al., 2007). Los dominios LysM son responsables de unir oligosacáridos con residuos de N-acetil-glucosamina (Mulder et al., 2006). Los ortólogos putativos de *LYK3* y *NFP* en *L. japonicus*, *NFR1* y *NFR5* (**Nod Factor Receptor 1 y 5**, respectivamente) poseen un dominio quinasa que es activo sólo en *NFR5*, el cual sería responsable de iniciar la transducción de señal mediante fosforilaciones (Madsen et al., 2011; Radutoiu et al., 2003) (**Fig. 6**). 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*, pero a diferencia de *LYK3* o *NFP*, las plantas mutantes con pérdida de función de *NFRe* sí desarrollan nódulos, aunque en menor número, y los eventos de infección no se encuentran afectados (Murakami et al., 2018).

Figura 6. Vías de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre raíces de leguminosas y rizobios. Los receptores LysM-RLK (NFP, LYK3) perciben los NFs producidos por los rizobios, que también involucra un receptor quinasa que contienen dominios con repeticiones ricas en leucinas (DMI2). La señal percibida desencadena oscilaciones de calcio dentro y alrededor del núcleo (*calcium spiking*), el cual requiere la acción del complejo conformado por el canal catiónico DMI1 y los canales de calcio CNGC15 y las proteínas del poro nuclear o nucleoporinas (NENA/NUPs). Dentro del núcleo las oscilaciones de calcio son percibidas por la quinasa dependiente de calcio y calmodulina CCaMK o DMI3, la cual interactúa físicamente con el factor de transcripción IPD3. En la epidermis, la E3 Ubiquitin ligasa LIN es requerida para la infección bacteriana y los factores de transcripción NSP1 y NSP2 en conjunto con ERN promueven la activación transcripcional de la nodulina ENOD11. A su vez, el factor de transcripción NIN es requerido

tanto en epidermis como en córtex, y los miembros de la familia NF-Y están involucrados directa o indirectamente en la activación de genes del ciclo celular que promueven las divisiones celulares en el córtex. *ENOD40* es un RNA altamente estructurado requerido para la activación de las divisiones celulares en el córtex. En estas células se activa la cascada de señalización en respuesta a citoquinas mediada por el receptor CRE1. Esta recepción activa los factores de respuesta RR1 y a su vez sus genes blanco RR4, NSP2 y un factor de transcripción bHLH.

La cascada de señalización activada por el NF desencadena oscilaciones en la concentración de calcio en el núcleo y su periferia denominados *calcium spiking*, las cuales promueven los cambios transcripcionales requeridos para la infección y organogénesis del nódulo (Ehrhardt et al., 1996; Groth et al., 2010; Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007). Aún se desconoce cómo es el mecanismo de transmisión de la señal generada por la percepción de los NFs desde la membrana plasmática hacia el núcleo generando el *calcium spiking*. Sin embargo, se han descrito varios genes que son requeridos para que el *calcium spiking* tenga lugar. Un receptor de tipo quinasa con dominios LRR (*Leucine Rich Repeat*) denominado *DMI2* (*Doesn't Make Infections 2*) en *M. truncatula* (Endre et al., 2002), o *SYMRK* (*Symbiosis Receptor Kinase*) en *L. japonicus* (Stracke et al., 2002), es esencial para la activación de dichas oscilaciones. Mutantes en *SYMRK* muestran deformación de los pelos radicales, pero son incapaces de nodular o formar hilos de infección (Stracke et al., 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de *DMI2/SYMRK* resulta en la formación espontánea de nódulos, es decir, en ausencia del rizobio (Ried et al., 2014; Saha et al., 2014). Aunque se desconoce el ligando extracelular de *DMI2/SYMRK*, se ha reportado que los dos dominios *MLD* (*Malectin-Like Domain*) presentes en el extremo extracelular de *DMI2* son indispensables para su acumulación 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 que se cree que *DMI2* podría reconocer una molécula bacteriana aun no identificada. En el otro extremo del receptor *DMI2*, su dominio quinasa intracelular 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 que se especula que este metabolito podría actuar como un segundo mensajero que transmite 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 *wild type* (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 interactúan 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 calmodulina, denominada *DMI3* en *M. truncatula* (Mitra et al., 2004) y *CCaMK* en *L. japonicus* (Levy et al., 2004). Mutantes en el gen *DMI3* presentan oscilaciones de calcio en respuesta al NF, pero no forman ITs (Mitra et al., 2004; Levy et al., 2004). Por otro lado, una mutación de ganancia de función de *DMI3* provoca la formación espontánea de nódulos (Tirichine et al., 2007a; 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 transcripcionales 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 en epidermis, como para la organogénesis del nódulo en córtex (Stougaard et al., 1999; Marsh et al., 2007). Recientemente, se ha reportado que *NIN* suprime la expresión de los genes tempranos de nodulación (*ENOD*), o *nodulinas*, 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, denominados *NSP1* (**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 genes *ENOD*. De manera secuencial, *NIN* induce la expresión de los factores de transcripción de tipo NF-Y (**Nuclear**

Factor Y), NF-YA1 y NF-YB1 (Soyano et al., 2013), los cuales promueven la reactivación del ciclo celular, reiniciando las divisiones mitóticas de las células corticales requeridas para la formación del nódulo (Combier et al., 2006; Zanetti et al., 2010; Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015; Rípodas et al., 2019).

Aún se desconoce cómo se transmite la señal disparada por el NF en células epidérmicas hacia las células del córtex donde tiene lugar la organogénesis del nódulo, ya que los NF no difunden a través del tejido vegetal. Se cree que las fitohormonas como citoquininas y auxinas estarían directamente relacionadas con la transmisión de la señal de NF. En el córtex, las citoquininas son percibidas principalmente por el receptor CRE1 en *M. truncatula* (**LHK1** en *L. japonicus*), el cual es requerido también para la infección en la epidermis (Miri et al., 2019). Mutaciones de ganancia de función en estos receptores dan lugar a la formación de nódulos espontáneos. Por el contrario, mutantes de pérdida de función son incapaces de formar nódulos, aunque exhiben IT, algunos de los cuales progresan hacia el córtex, mientras otros se detienen o se desvían en las células epidérmicas (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Murray et al., 2007; Tirichine et al., 2007b). Esto indica que la señalización de citoquininas es necesaria y suficiente para disparar la organogénesis del nódulo. 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**, **bHLH** (**basic Helix-Loop-Helix**) (Ariel et al., 2012), y **NIN** en córtex (Liu et al., 2019). 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).

Si bien se han descubierto muchos de los elementos que participan de la vía de la nodulación, aún quedan otros por descubrir, ya que la genética directa, utilizada como herramienta principal de investigación de esta vía, se encuentra limitada por la redundancia génica y los efectos de compensación.

3. Mecanismos de regulación de la expresión génica

La expresión génica es un proceso dinámico y altamente regulado a múltiples niveles, y existen mecanismos de regulación en cada uno de sus pasos hasta la obtención del producto funcional. A nivel de la cromatina, los distintos grados de compactación y posicionamiento de los nucleosomas, así como los distintos patrones de acetilación y metilación de histonas, modifican la accesibilidad de los factores de transcripción (Lauria and Rossi, 2011). Las marcas epigenéticas, como el nivel de metilación de citosinas en los dinucleótidos CG de las regiones codificantes, también influyen sobre las modificaciones de histonas en esa región (Liu et al., 2018). Luego de la síntesis de los primeros 10-20 nucleótidos (*nts*) el pre-mRNA es modificado por la adición de un *cap* 5' m⁷GpppN que estabiliza el mRNA y que posee una función importante durante la traducción (Bailey-Serres et al., 2009). Posteriormente, ocurre el clivaje 3' del transcripto y la adición de una cola de poli(A) de 15-300 nts. Esta adición protege al transcripto de la degradación y facilita su traducción. La mayoría de los transcriptos contienen al menos un intrón en la región 5'-UTR (***Untranslated Region***) y/o en la región codificante (***CoDing Sequence, CDS***). Los intrones son reconocidos por un complejo denominada *spliceosoma* que los elimina en simultáneo con la transcripción en la mayoría de los casos. En cada etapa de procesamiento, el mRNA se asocia con proteínas de unión a RNA (***RNA Binding Protein, RBP***) incluyendo la proteína de unión al *cap* 5' (***CBP***) y de unión al poli(A) (***polyA Binding Proteins, PABP***), y otras RBPs en base a la secuencia del transcripto (Lorković, 2009). Estos mRNAs decorados son transportados al citoplasma a través del poro nuclear, donde deben pasar una primera ronda de traducción. Aquellos mRNAs que presentan un codón de terminación prematuro son degradados vía el mecanismo de control de ***Nonsense Mediated Decay (NMD)***, presente en plantas al igual que en otros eucariotas (Kerényi et al., 2008). Una vez en el citoplasma, aquellos mRNAs que pasan el mecanismo de control pueden ser secuestrados o traducidos. Los transcriptos que son traducidos tienen unidas proteínas en el 5' *cap* y el 3' poli(A), que interaccionan para circularizar el mRNA, haciendo más eficiente la reiniciación de la traducción (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). Luego de la traducción, el producto proteico puede ser procesado mediante modificaciones postraduccionales, transportado, ensamblado dentro de complejos multiproteicos o

degradado. También se ha descrito la posibilidad de que la degradación de los transcriptos podría darse co-traduccionalmente (Yu et al., 2016).

La transcripción también es regulada por secuencias que actúan en *cis*, de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa II DNA dependiente (*RNA Pol II*), que sintetiza un transcripto primario, el pre-mRNA. Por otro lado, múltiples RNAs pequeños (*small RNA*, *sRNA*), producidos mediante diversos mecanismos, regulan el silenciamiento transcripcional y post-transcripcional de genes. Los sRNAs ejercen su acción a través de la metilación de citosinas, la degradación de mRNAs y/o la represión traduccional (Chen, 2012; Law and Jacobsen, 2010; Voinnet, 2009).

3.1 La regulación postranscripcional

La regulación postranscripcional de los mRNAs es un medio crucial por el cual las células controlan la expresión génica, ya que permite que se produzcan cambios rápidos y espacialmente limitados en la síntesis de proteínas específicas. Desde su síntesis hasta su degradación, los mRNAs van acompañados por proteínas RBPs formando los denominados complejos ribonucleoproteicos mensajeros (*Ribo Nucleo Protein messengers*, *mRNPs*). La composición del mRNP controla cada aspecto de la vida del mRNA, desde el procesamiento del pre-mRNA, hasta su localización celular, la regulación de la traducción, almacenamiento y degradación del mRNA (Buchan, 2014). Las transiciones entre estos eventos están acompañadas por un importante remodelamiento de mRNPs e intercambio de proteínas (Erickson and Lykke-Andersen, 2011).

3.2 Regulación citoplasmática de mRNAs

En las células eucariotas, los mRNPs pueden encontrarse tanto en el núcleo, como en el citoplasma. Estos mRNPs pueden formar asociaciones transitorias o estables formando compartimentos sin membrana que presentan una alta concentración de proteínas y RNA. Los mRNPs son dinámicos y dependen de RNA para su ensamble. Se piensa que la formación de gránulos de RNP dinámicos es una estrategia de las células para concentrar componentes celulares específicos en un espacio reducido, y así

acelerar o mejorar la eficiencia de los procesos celulares (Protter and Parker, 2016). Trabajos recientes han avanzado en la comprensión de la regulación del destino de los mRNAs dentro de estas estructuras, así como también en la dinámica de su ensamblado, desensamblado y su tránsito a través de la célula. En humanos, se ha encontrado que los mRNPs están implicados fuertemente en una variedad de enfermedades, especialmente desórdenes degenerativos, por lo que esta temática está atravesando por un momento de auge muy importante (Buchan, 2014). Sin embargo, a pesar de los avances de los últimos años en la comprensión de los mRNPs y su implicancia en la expresión génica, la relación entre su estructura, composición y función sigue siendo poco clara (Hubstenberger et al., 2017). Existen gránulos de RNPs en el núcleo, por ejemplo el nucléolo, los cuerpos cajal (*Cajal bodies*), *paraspeckles* (Spector, 2006), como así también gránulos en tejidos específicos como los gránulos neuronales implicados en el remodelado sináptico, o los gránulos en células germinales que participan en el almacenaje de mRNAs maternos (Barbarese et al., 2013; Brangwynne et al., 2009).

La clasificación específica de los mRNPs depende de su contexto celular, su función hipotética y la presencia de marcadores de proteínas particulares. A pesar de la diversidad de gránulos de mRNPs que existen, todos ellos presentan algunas características en común: (1) todos los mRNPs contienen mRNAs inactivos traduccionalmente que son capaces de reasociarse a la maquinaria de traducción en respuesta a señales apropiadas (Bregues et al., 2005; Ilipowicz, 2006; Nagamori et al., 2011; Hüttelmaier et al., 2005); (2) muchas RBPs y muchas especies de mRNAs son compartidas por los mRNPs (Buchan and Parker, 2009), de hecho, aglomerados proteicos concentrados en un gránulo pueden relocalizarse en otro tipo de gránulo a través del tiempo o siguiendo cambios de las condiciones celulares (Kedersha et al., 2005a; Buchan et al., 2008; Wang and Abrams, 2014); (3) los gránulos de mRNPs muestran interacciones dinámicas entre sí como contactos directos (*docking*), fusiones o una aparente maduración de un tipo de gránulo a otro (Kedersha et al., 2005a; Hoyle et al., 2007). La interpretación más simple es que ocurra un intercambio de mRNA o proteínas entre gránulos, aunque esta teoría no ha sido demostrada directamente (Wang and Abrams, 2014).

En el citoplasma existen dos mRNPs muy conservados, presentes tanto en células animales como vegetales: los cuerpos de procesamiento o **PBs**, y los gránulos de estrés, o **SGs**. Ambos se forman a partir de la aglomeración de mRNAs que por algún motivo no están siendo traducidos (**Fig. 7**). Los SGs se forman a partir de mRNAs detenidos en el inicio de la traducción (Anderson and Kedersha, 2009; Buchan and Parker, 2009; Parker and Sheth, 2007), conteniendo algunos factores de inicio de la traducción, variedad de RBPs y muchas otras proteínas que no unen RNA (Jain et al., 2016). Los PBs contienen mRNAs asociados a represores traducionales y a la maquinaria de degradación. Dentro de los PBs, los mRNAs pueden ser marcados para su degradación a partir de la eliminación de su protección en el extremo 5' (CAP- 7-metil guanilato –m⁷G_{ppp}), proceso denominado *decapping*. Sin embargo, no todos los mRNA en PBs son degradados. Mediante técnicas de marcación de mRNA, se demostró que ciertos mensajeros que se concentran en PBs bajo condiciones de estrés, pueden retornar a la maquinaria traduccional al recuperarse el estado basal (Aizer et al., 2014). Al mismo tiempo, SGs y PBs pueden solaparse e interactuar entre sí, sugiriendo una dinámica de los mRNA conjunta entre estos mRNPs y la maquinaria traduccional, donde cada mRNA puede ser traducido, almacenado o degradado según los requerimientos celulares (**Fig. 7**).

Figura 7. Descripción general de la traducción, el almacenamiento y la degradación del mRNA citoplasmático en plantas. A. Los mRNA citoplasmáticos que se traducen activamente forman parte de los polisomas y permanecen en estos complejos hasta que se dañan o se reprimen. B. La represión de la traducción puede ser el resultado de múltiples causas (disminución o fosforilación de factores de traducción específicos, cambio de la unión de ciertas RBPs o estancamiento de ribosomas), que limitan el inicio de la traducción o la traslocación del ribosoma, promoviendo la transición a un mRNP reprimido traduccionalmente, donde el mRNA es secuestrado por RBPs (por ejemplo, UBP1, G3BP y RBP47/45) o

degradados a través de diferentes vías. **C.** El secuestro de mRNA se desencadena típicamente por estrés celular, que sirve como punto de nucleación y clasificación para el ensamblaje de mRNPs en SGs para almacenamiento, o PBs para degradación. **D.** Durante un período de recuperación del estrés, los mRNA intactos almacenados en SGs pueden volver a ingresar a la traducción a través de un proceso facilitado por una chaperona (por ejemplo, HSP101 durante la recuperación del estrés térmico). Algunos mRNAs liberados a partir de SGs pueden ser objeto de degradación después del estrés. **E.** En general, la degradación del mRNA comienza por la eliminación de la cola protectora poli(A) 3' mediante diferentes clases de deadenilasas (Nocturnina, **Poli(A) RNAasa** específica (**PARN**), y el complejo **CCR-NOT**), luego se produce la degradación en sentido 3' - 5' por el complejo Superkiller (SKI)- exosoma multimérico y/o la exonucleasa RRP44B/SOV. Después de la deadenilación, la degradación del mRNA también puede ocurrir en el sentido 5' - 3'. Los mRNA degradados a través de esta vía pueden localizarse en el citosol y/o en PBs, donde el complejo multiproteico de *decapping* de mRNA elimina el cap 5' y, posteriormente, la exorribonucleasa XRN4 cataliza la hidrólisis de los nucleótidos en sentido 5' - 3'. **F.** Además de la vía de degradación dependiente de la deadenilación, los mRNA reprimidos traduccionalmente pueden degradarse directamente en la dirección 5' - 3', cotraduccionalmente por acción de XRN4. Este modo de degradación no requiere la previa deadenilación del mRNA, pero puede requerir el *decapping* del mRNA. La degradación progresiva exonucleolítica 5' - 3' del mRNA por XRN4 genera una "firma" de codón por codón de tres nucleótidos, que se cree refleja el movimiento de los ribosomas desde el extremo 5' a lo largo del transcripto.

3.2.1 Cuerpos de Procesamiento o *Processing Bodies* (PBs)

Los cuerpos de procesamiento, o *Processing Bodies* (**PBs**) son agregados citoplasmáticos compuestos principalmente de mRNAs reprimidos en la traducción y de proteínas relacionadas con la degradación de mRNA (Thedieck et al., 2013). En condiciones normales, cada célula puede contener entre 4 y 7 PBs de aproximadamente 0,5 μm de diámetro. La condensación de los PBs se genera gracias a interacciones multivalentes específicas entre cientos de proteínas y miles de mRNAs que constituyen los PBs, generando una red de interacciones que puede ser remodelada por la acción de helicasas (Hubstenberger et al., 2017). Se ha descrito que los represores de la traducción son esenciales para la formación de PBs, no así la maquinaria de degradación, y además que los PBs pueden desensamblarse sin alterar el decaimiento de los mRNAs. Así, aquellos mRNAs encontrados en PBs pueden estar destinados a degradación o almacenaje, dependiendo del mRNA y/o del contexto (Aizer et al., 2014; Decker and Parker, 2012).

Entre los componentes proteicos que conforman los PBs pueden encontrarse represores de la traducción, proteínas involucradas en el decaimiento de mRNAs, de *decapping* y proteínas constituyentes del NMD. Por otro lado, no se encuentran subunidades ribosomales en PBs ni factores de iniciación de la traducción, y hay una acumulación del represor 4E-T que previene la carga de los factores de iniciación de la

traducción. La presencia de estos componentes sugiere que los mensajeros en PBs estarían reprimidos *upstream* del inicio de la traducción, por lo que tienen la capacidad de volver a unirse a polisomas cuando es requerido (Aizer et al., 2014; Ilipowicz, 2006; Teixeira et al., 2005).

Más de un tercio de los mRNAs presentes en una célula están acumulados en PBs, por lo que el destino a PBs no es un evento postranscripcional menor. Sin embargo, existe cierta especificidad de mRNAs que son dirigidos a PBs, y todos ellos presentan algunas características comunes: (1) los mRNAs presentes en PBs presentan menores niveles de traducción que otros mensajeros con igual nivel de expresión; (2) presentan menor densidad de ribosomas, lo que implica que no existe una relación directa entre lo que se transcribe y lo que se traduce; (3) la longitud de las colas poli (A) de los mRNAs presentes en PBs es heterogénea.

También se observa que un mRNA puede estar enriquecido diferencialmente en PBs en función de la posición que ocupan las RBP acompañantes (en *UTR* o *CDS*), por lo que el contexto de los elementos de unión también es importante para el destino de los mRNAs. En concordancia con la importancia del 3'-UTR de los mRNAs, se ha demostrado que variantes isomórficas del 3'-UTR de un mismo mensajero (variantes de un mismo mRNA generadas por la combinación de *splicing* alternativo y/ o poliadenilación alternativa), están implicadas en la regulación de la traducción y la localización del mRNA, a menudo a nivel de células específicas dentro de un tejido (Floor and Doudna, 2016; Hubstenberger et al., 2012; Merritt et al., 2008).

Entre los mRNAs enriquecidos en PBs se encuentran los que codifican para factores involucrados en el remodelamiento de la cromatina, en el control de la transcripción de la RNA Pol II, el procesamiento del RNA, la división celular, la diferenciación, la morfogénesis y el desarrollo. Estos resultados sugieren que estos mRNAs reprimidos son un reservorio que se puede movilizar en respuesta a, por ejemplo, un estrés. Además, se vio que los mRNAs que codifican subunidades del mismo complejo enzimático o componentes de una ruta metabólica tienden a estar, o bien todos enriquecidos o bien todos ausentes en PBs. Esto sugiere una compartimentalización de los regulones de mRNA como sistema de regulación postranscripcional (Standart and Weil, 2018; Hubstenberger et al., 2017).

3.2.1.1 *Decapping Protein 1 (DCP1)* y *Exoribonuclease 4 (XRN4)* como marcadores de PBs

La degradación general citoplasmática de los mRNAs en eucariotas es iniciada por la remoción de la cola poli (A) 3', proceso reversible denominado *deadenilación*, seguido por la hidrólisis del CAP 5' (*decapping*) y la subsecuente degradación del mensajero en dirección 5'- 3' por las *Exoribonucleasas 1/4 (XRN1, XRN4)* (Siwaszek et al., 2014). Alternativamente, los mRNAs deadenilados pueden ser degradados en sentido 3'- 5'. Aunque ambos procesos pueden ocurrir en PBs, la degradación 3'- 5' se da principalmente vía el exosoma en el citoplasma (Mitchell et al., 1997).

El *decapping* es un paso clave en el mecanismo de degradación de mRNAs en dirección 5'- 3', porque marca los mensajeros para su degradación irreversiblemente. Debido a esto, se encuentra sujeto a numerosos controles. El *decapping* también es importante en el control de aquellos mRNAs aberrantes que presentan codones de terminación prematuros, los cuales son *decapeados* y degradados en sentido 5'- 3' sin el requerimiento de una deadenilación previa (Muhlrad and Parker, 1994).

El *decapping* de los mRNAs es llevado a cabo por la enzima *Decapping Protein 2 (DCP2)*, que hidroliza la estructura CAP 5' en presencia de cationes divalentes Mn^{2+}/Mg^{2+} , liberando 7mGDP y el extremo 5' del mensajero monofosforilado (Arribas-Layton et al., 2013). DCP2 es la subunidad catalítica de un complejo heteromérico que incluye cofactores que median su actividad y reguladores que coordinan el *decapping* con la represión traduccional, deadenilación e hidrólisis del cuerpo del mRNA. En *Arabidopsis*, *DCP1* y *Varicose (VCS)/ Enhancer of mRNA Decapping 4 (EDC4)* modulan la actividad de DCP2 (Xu et al., 2006), aunque aún se desconoce con precisión cómo lo hacen. Las tres proteínas conforman el núcleo del complejo indispensable para el *decapping* de los mRNAs y es esencial, por ejemplo, para el desarrollo normal postembriónico (Xu and Chua, 2011). Basado en análisis de mutantes, se observó que VCS regula la dormancia y la germinación de semillas en *Arabidopsis* (Basbous-Serhal et al., 2017), participa en la integración de la degradación de mRNA por silenciamiento vía los miRNAs (Voinnet, 2009), y también ha sido implicada en la interacción planta-hongo patógeno en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Petre et al., 2016). Existe un cuarto

integrante de este complejo de *decapping* descrito en *Arabidopsis* denominado **DCP5**, que presenta dominio de unión a RNA e interactúa con DCP1 y DCP2, pero no regula directamente la actividad de DCP2 (Xu and Chua, 2009). Sin embargo, esta proteína es necesaria para la formación de PBs, el *decapping* de mRNA y la represión traduccional asociada a degradación de mRNA. Plantas con actividad de DCP5 atenuada presentan defectos en el desarrollo de las plántulas, similares a plantas mutantes en alguno de los integrantes del núcleo del complejo de *decapping*, como perturbación en la germinación o en la formación de nervaduras en las hojas (Xu and Chua, 2009). También se ha descrito que plantas mutantes en DCP2 son capaces de germinar, pero luego de seis días las plántulas no pueden continuar su desarrollo (Xu et al., 2006). Estas evidencias sugieren que la degradación de mRNAs a través del *decapping* en PBs requiere de una regulación muy fina y juega un rol muy importante en las transiciones del desarrollo o la reprogramación génica, y una sobreacumulación de mRNAs estaría perturbando estos procesos (Chantarachot and Bailey-Serres, 2017; Xu and Chua, 2011).

Por otra parte, las proteínas del núcleo del complejo de *decapping* pueden ser fosforiladas en residuos específicos e influir sobre su actividad (Xu and Chua, 2012; Soma et al., 2017). Se describió que mutaciones que previenen la fosforilación de dichos residuos generan plantas de *Arabidopsis* susceptibles a estrés osmótico (Xu and Chua, 2012; Soma et al., 2017), por lo que ajustes en el transcriptoma a través del *decapping* tienen relevancia sobre la resiliencia de las plantas frente a estrés osmótico.

La proteína XRN4 de *Arabidopsis* es la equivalente funcional de la exoribonucleasa XRN1 descrita en levadura. La misma degrada mRNA 5'-monofosfato generados por *decapping* o por clivaje endonucleolítico mediado por sRNA (Gregory et al., 2008; Souret et al., 2004). Existen evidencias de que XRN4 tiene como *target* un set limitado de transcriptos endógenos poliadenilados en condiciones de crecimiento normal (Trevisan, 2004; Gregory et al., 2008; Rymarquis et al., 2011; Souret et al., 2004). No obstante, XRN4 es un componente importante en el sistema de respuesta a etileno (Potuschak et al., 2006) y está implicada junto a la proteína **LARP1a** en el procesamiento masivo de más de 4500 mRNAs frente a estrés por calor en plántulas de *Arabidopsis* (Merret et al., 2013), lo que indicaría un rol más importante para XRN4 en la adaptación de las plantas frente a un estrés.

3.2.2 Gránulos de estrés o *Stress Granules* (SGs)

Los *Stress Granules* (SGs) son mRNPs citoplasmáticos que se forman cuando el inicio de la traducción está detenida, ya sea por una reducción en la tasa de traducción en respuesta a un estrés como las altas temperaturas (Weber et al., 2008) o hipoxia (Sorenson and Bailey-Serres, 2014), por la adición de drogas que bloquean el inicio de la traducción (Dang et al., 2006; Mazroui et al., 2006; Mokas et al., 2009), debido al silenciamiento de factores de inicio de la traducción específicos (Mokas et al., 2009), o por sobreexpresión de RBPs que reprimen la traducción (Mazroui, 2002; Kedersha et al., 2005; Wilczynska, 2005; De Leeuw et al., 2007; Gilks et al., 2004). Como sucede con los PBs, se puede estimular la formación de SGs si se induce la disociación de los ribosomas de los mRNAs con puromicina, mientras que tratamientos con cicloheximida que bloquean el movimiento de los ribosomas sobre el mRNA, inihiben la formación de SGs. Esto sugiere que los mRNAs unidos a polisomas no podrían entrar a SGs (Buchan et al., 2008; Kedersha et al., 2000). Cabe destacar que no todas las formas de bloqueo de la traducción inducen la formación de SGs. Se ha descrito que mutantes *knockdown* del factor temprano del inicio de la traducción 3 (*eIF3*), o el impedimento de formar la subunidad ribosomal 60S no generan la aparición de SGs (Mokas et al., 2009; Ohn et al., 2008). Esto sugiere que la formación de SGs se daría sólo en un momento específico del inicio de la traducción, o bien que ciertos factores del inicio de la traducción serían claves en el ensamblado de los SGs (Buchan and Parker, 2009).

Los SGs contienen mRNAs que conservan su cola poli(A) junto a proteínas de unión a poli(A) (*Poli (A) Binding Proteins, PABPs*), y otras RBPs como *RNA Binding Protein 47 (RBP47)* y *Oligouridylate Binding Protein 1 (UBP1)*. Los SGs con mRNAs estabilizados pueden incluir factores tempranos del inicio de la traducción como *eIF3*, *eIF4E*, *eIF4G*, *eIF4B* o *eIF4A* y la subunidad menor ribosomal 40S, indicando que estos complejos están en equilibrio dinámico con ribosomas en activa traducción (Kedersha et al., 1999; Kimball et al., 2003; Mazroui et al., 2006; Anderson and Kedersha, 2006). Además de RBPs y factores de transcripción, los SGs contienen proteínas con dominio del tipo prión (*Prion- Like Domains, PrLDs*), los cuales se sabe que en levaduras tienen la capacidad de unirse al mRNA. Sorprendentemente, casi la mitad de las proteínas presentes en SGs no tienen ni PrLD, ni unen a mRNAs, lo que sugiere que éstas estarían unidas por

interacciones múltiples y específicas proteína-proteína funcionando para ensamblar los SGs (Jain et al., 2016).

Los SGs contienen una estructura estable denominada *Core* rodeada de otra capa más dinámica denominada *Shell*, donde el ensamblado, desensamblado y las transiciones entre estas dos capas están moduladas por numerosas proteínas y complejos remodeladores de RNA y ATPasas (Jain et al., 2016) (**Fig. 8**). Se cree que esta estructura de un núcleo estable rodeado de otra capa más laxa y dinámica es una disposición muy común entre los mRNPs, incluido el nucléolo (Brangwynne et al., 2011), la cual permitiría ensamblar mRNPs dentro de los SGs en una estructura más estable y así controlar mejor su localización y reunir aquellos mRNAs relacionados para coordinar su regulación conjunta (Rinn and Guttman, 2014).

Figura 8. Esquema de la estructura Core-Shell de SGs. Los SGs están compuestos por una capa estable, denominada *Núcleo (Core)*, círculos gris oscuro), rodeada por otra capa más laxa denominada cubierta (*Shell*, espacio gris claro). El ensamble y dinámica de los SGs está modulada por diferentes ATPasas, como proteínas chaperonas *chaperonin containing TCP-1* (complejo **CCT**), el complejo *minichromosome maintenance* (complejo **MCM**), y helicasas **RVB**. Estos complejos enzimáticos fueron encontrados formando parte de los núcleos de SGs, y serían los responsables de la dinámica de los mRNPs en diferentes etapas del ensamble y desensamble de los SGs (Jain et al., 2016).

Con respecto a la composición de mRNAs en SGs, se estima que aproximadamente el 10% del total de los RNAs presentes en una célula están concentrados en SG, de los cuales cerca del 78 % son mRNAs, y sólo el 0,6% son *non coding RNAs (ncRNA)* en

mamíferos. Algo similar ocurre en levaduras, donde el 95% de su composición son mRNAs (Khong et al., 2017). Prácticamente todos los mRNAs están presentes, en mayor o menor cantidad y porcentaje, en SGs. Por ejemplo, la actina que es una de las proteínas más abundantes, sólo representa el 0,5% del total de los mRNAs presentes en SG. Esto hace pensar que las interacciones requeridas para que un mRNA se dirija a SG no está limitada a un grupo particular de mRNAs, y las pequeñas cantidades de moléculas de cada mensajero específico sugiere que el efecto de los SG sobre la acumulación de mRNAs no sería tan grande. No obstante, se han encontrado algunas características comunes de los mRNAs presentes en SGs, y hay diferencias en el enriquecimiento cuantitativo de mRNAs específicos, dependiendo del estrés bajo el cual se encuentre la célula. El efecto de los SGs sobre las funciones celulares tiene mayor impacto si, por ejemplo, se ven involucrados algunos componentes de una misma vía de señalización (Kedersha et al., 2013). A modo de ejemplo, durante las infecciones virales en humanos se han descrito gránulos de estrés antivirales (avSGs), que reclutan numerosas proteínas antivirales y estimulan la inducción de la respuesta inmune y la resistencia viral (Onomoto et al., 2012; Reineke and Lloyd, 2015; Reineke et al., 2015). Se ha propuesto que los SGs modulan vías de señalización ya que son capaces de secuestrar componentes claves como TOR, RACK1 o TRAF2 (Arimoto et al., 2008; Kim et al., 2005; Takahara and Maeda, 2012; Thedieck et al., 2013). También tienen implicancias más amplias por secuestrar componentes relacionados al metabolismo de los RNA, lo cual puede influir enormemente en la fisiología general de la célula.

Los mRNAs presentes en SG presentan una vida media más corta y tienen un contenido GC menor, son mucho más largos que la longitud media de los mRNA totales (7,1 Kb contra 4,2Kb) y los mRNA que no se encuentran en SG presentan una longitud de 2,5 Kb, donde la mayor diferencia la aporta la secuencia codificante (Khong et al., 2017).

3.2.2.1 RNA Binding Protein 47 (RBP47) y Oligouridylate Binding Protein 1 (UBP1) como marcadores de SGs

UBP1 se encuentra expresada constitutivamente y conservada en el genoma de muchas plantas. Es una proteína nuclear con una fuerte preferencia a unirse a

secuencias ricas en nucleótidos de Uracilo de mRNAs. Se encuentra principalmente en el núcleo de células de plantas, asociada a secuencias poliadeniladas de RNAs, aunque también se encuentra en citoplasma formando parte de SGs (Delaux et al., 2015). Lambermon y colaboradores (Lambermon et al., 2000) demostraron que cuando UB1 se sobreexpresa en protoplastos, se observa una acumulación de mRNAs reporteros que carecen de intrones, o contienen intrones subóptimos. Aunque se desconoce su mecanismo de acción en el procesamiento de intrones, se cree que la acumulación de mRNAs reporteros se debe a que UB1 interactúa con el 3'-UTR y protege al mRNA de la degradación. Se ha observado que el *splicing* de los mRNA y la acumulación de los mismos pueden ser desacopladas. Esto sugiere dos efectos independientes de la UB1, por lo que se postula que UB1 estaría implicada en múltiples pasos de la maduración de los pre-mRNAs en el núcleo de células vegetales (Lambermon et al., 2000).

UBP1 presenta tres dominios de reconocimiento de RNA (*RNA Recognition Motif*, *RRM*). RRM es el dominio de unión a RNA más abundante encontrado entre las RBPs. Además, UB1 contiene una secuencia rica en Glutamina (*Q-rich*) en su extremo N-terminal (N_t) y un extremo C-terminal (C_t) rico en aminoácidos Glicina y Tirosina (*GY-rich*) (Lorkovic, 2002). Los dominios RRM presentan dos secuencias consenso denominadas *RNP1* (un octámero), y *RNP2* (un hexámero) dentro de una estructura proteica conservada de 80 aminoácidos (Fig. 9).

Figura 9. Representación esquemática de la estructura modular de UB1 y RBP47. UB1 y RBP47 presentan tres dominios RRM (*RRM*), cada uno de ellos con las secuencias *RNP1* (un octámero K/R/S- G/S- F/Y- G- F- V- R/S/H- Y/F), y *RNP2* (un hexámero V- Y- V- G- N- I/L), marcadas como bandas negras dentro de los dominios *RRM*. Los dominios RRM1 y RRM2 son adyacentes entre sí, mientras que el dominio RRM3 se encuentra separado por un linker de longitud variable no conservada (*indefinido*). Además, contienen secuencias ricas en Glutamina (*Q-rich*) en su extremo N_t , y hacia el extremo C_t un enriquecimiento de aminoácidos Glicina y Tirosina (*GY-rich*). Para la integración de UB1 y RBP47 a SGs, son importantes tanto sus dominios RRM, como su extremo N_t rico en glutaminas, que es del tipo PrLD.

A pesar de haber sido descripta inicialmente como una proteína nuclear, nuevas evidencias mostraron que UBP1 puede encontrarse en citoplasma y se ha sugerido que posee una función de protección del mRNA contra su degradación. Estudios de microscopía confocal muestran que UBP1 forma gránulos de mRNPs en el citoplasma cuando plántulas de *A. thaliana* son sometidas a hipoxia (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). En estas condiciones, la tasa de traducción general disminuye drásticamente, pero la unión de mRNAs a UBP1 aumenta. Al mismo tiempo, los genes requeridos para la supervivencia en condiciones de hipoxia aumentan su tasa de traducción, y evitan su unión a UBP1. Este proceso se revierte cuando las células se reoxigenan, lo que hace pensar que los mRNPs que contienen UBP1 tendrían una función de protección y almacenaje provisoria de mRNA en citoplasma (Sorenson and Bailey-Serres, 2014).

UBP1 es la proteína vegetal con mayor porcentaje de identidad a las proteínas de mamíferos TIA1 y TIAR (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). Estas proteínas son esenciales para el ensamblado de SGs en células de mamífero en condiciones de estrés (Kedersha et al., 1999), por lo que se cree que UBP1 tendría una función e importancia similar en células vegetales.

Al igual que UBP1, RBP47 es una RBP con especificidad por secuencias ricas en uracilos, presente principalmente en el núcleo unida a secuencias poliadeniladas de RNA, con una estructura similar a UBP1 de tres dominios RRM, y conteniendo las secuencias consenso RNP1 y RNP2. Además un extremo N_t rico en glutaminas, y un dominio C_t rico en glicinas y tirosinas (Lorkovic et al., 2000) (**Fig. 9**). Los dos dominios RRM más cercanos al extremo N_t son adyacentes entre sí, mientras que el tercer dominio RRM está separado de los anteriores por un *linker* de longitud variable según las variantes de RBP47 y la especie (Lorkovic et al., 2000). A pesar de estas similitudes con UBP1 (preferencia de unión a uridilatos en núcleo, estructura proteica y dominios), RBP47 no afecta el *splicing* ni la acumulación de RNAs reporteros en protoplastos vegetales. A pesar de presentar una organización de dominios similar y tener un extremo N_t rico en glutaminas, las estructuras primarias de las proteínas UBP1 y RBP47 tienen un porcentaje de identidad bajo (31-35%), (Lorkovic et al., 2000). RBP47 puede transportarse al citoplasma acompañando mRNAs e integrarse a SGs, protegiendo a los mRNA de la degradación por unión a sus extremos 3'-UTR (Weber et al., 2008). Se ha

demostrado que para su integración a SGs son importantes tanto sus dominios RRM, como su extremo N_t rico en glutaminas, que es del tipo PrLD (Weber et al., 2008). Incluso, células con versiones truncadas de RBP47 no pueden ensamblar SGs. Esto sugiere que RBP47 no solamente es una proteína componente del *Core* de SGs, sino que juega un rol central en el ensamble de estos mRNPs (Weber et al., 2008). Dada su similitud a la proteína TIA-1 de mamíferos, se cree que RBP47 cumpliría una función similar, actuando como regulador de las transiciones de mRNPs entre polisomas, PBs y SGs (Kedersha et al., 2002, 2005a). Un aspecto interesante en relación a esta posibilidad es que se conocen varias isoformas de estas proteínas en plantas: tres variantes de UBP1 y 4 de RBP47 en *A. thaliana* (Lorkovic, 2002), aunque se desconoce si tienen actividad redundante, o funciones específicas en la célula (Weber et al., 2008).

4. Estudios de la dinámica de mRNAs en los diferentes mRNPs a escala genómica

El destino postranscripcional de un mRNA está fuertemente influenciado por las RBPs unidas a él. Las RBPs desempeñan un papel crítico en la mediación y regulación del procesamiento, transporte, localización, traducción y decaimiento de todos los transcriptos que genera una célula (Chen and Manley, 2009; Licatalosi and Darnell, 2010). Dada su importancia, se han realizado importantes esfuerzos en las últimas décadas para identificar experimentalmente las RBP y sus mRNA *target*, para entender la función fisiológica de los mRNPs en el “ciclo de vida” del RNA. En general, se han empleado dos enfoques para aislar complejos RNA-proteína (Zhong Wang and Snyder, 2001; Wang et al., 2008). El primero utiliza la inmunoprecipitación para recolectar una RBP específica de interés a partir de lisados celulares y los RNA que purifican conjuntamente con dicha proteína (**Fig. 10**). En este método, es ventajoso llevar a cabo el enlace covalente entrecruzado (*crosslinking*) de los complejos RNA-proteína (las células intactas se tratan con formaldehído o luz UV) previo al paso de la lisis celular para aumentar la captura de proteínas que se asocian con el RNA *target* de forma transitoria, y para minimizar la reasociación de proteínas durante la purificación que resulta en interacciones que no reflejan fielmente los mRNPs *in vivo* (Pan et al., 2008; Mortazavi et al., 2008) (**Fig. 10A**). Cuando se combina con la tecnología de secuenciación masiva de RNA, este enfoque puede utilizarse para identificar los mRNAs que son *targets* de una

RBP conocida a nivel de todo el transcriptoma y mapear la posición de unión a lo largo del mRNA en una resolución cercana a nucleótidos (Sultan et al., 2008; Ulitsky et al., 2012) (**Fig. 10B**). Estos enfoques centrados en la proteína se han utilizado ampliamente para generar mapas de unión de diferentes RBP abarcando todo el transcriptoma y han aportado información importante sobre cómo se controla el procesamiento del mRNA en la célula (Huelga et al., 2012; Yeo et al., 2009; Xue et al., 2009; Zhang et al., 2010). Estos métodos también se han utilizado para obtener los primeros datos sobre algunas de las proteínas que pueden interactuar con *long noncoding* RNAs (*lncRNAs*) (Zhao et al., 2008; Rinn et al., 2007; Khalil et al., 2009). Debido a que estos métodos requieren el conocimiento de la proteína, tienen una utilidad más limitada para definir que proteínas se asocian con un mRNA dado (Mchugh et al., 2014).

Figura 10. Métodos centrados en proteínas para la detección de interacciones RNA-Proteína. (A) Esquema de métodos nativos y desnaturalizantes. En estos métodos, se induce un enlace covalente (*crosslinking*, o entrecruzamiento) de los complejos RNA-proteína (las células intactas se tratan con formaldehído o luz UV) para aumentar la captura de proteínas que se asocian con el RNA *target* de forma transitoria, y para minimizar la reasociación de proteínas durante la purificación que no reflejan fielmente los mRNPs *in vivo*. Cuando se combina con la tecnología de secuenciación masiva, este enfoque puede utilizarse para identificar los mRNA *target* de una RBP conocida a nivel de todo el transcriptoma y mapear la posición de unión a lo largo del RNA. Los entrecruzamientos RNA- proteína están representadas por **X**. Las interacciones no específicas en solución están marcadas (*Non Specific*, **NS**) y representadas por fragmentos de RNA azul. **(B)** Análisis informático para la identificación de sitios de interacción. El panel superior muestra la distribución de lecturas para dos transcritos: uno de baja abundancia, y otro de alta abundancia que contienen una región que está enriquecida dos veces en la muestra inmunoprecipitada (*IP*) con respecto a una muestra control. Las mediciones de enriquecimiento en el caso de baja abundancia

tienen grandes variaciones. El panel inferior muestra los valores de enriquecimiento simulados en una región de baja abundancia y una región de alta abundancia, que tienen un enriquecimiento de dos veces en la muestra de IP. Para la región de baja abundancia, el *Log* de la tasa de cambio (*fold change*) a menudo está lejos del verdadero valor subyacente, mientras que la transcripción abundante muestra una estimación de enriquecimiento más consistente. Figura adaptada de Mchugh et al. (2014).

En el segundo método, conocido generalmente como captura de RNA, un RNA de interés se marca y se recupera de lisados celulares con el propósito de purificar y caracterizar las RBPs que interactúan con él (**Fig. 11**). Para el aislamiento de complejos de RNA-proteína que existen *in vivo*, el RNA *target* se expresa típicamente como un transgen que contiene etiquetas de secuencia dentro de su 3'-UTR que se unen con alta afinidad a una proteína (por ejemplo, proteína de la cubierta del bacteriófago MS2) o pequeñas moléculas (tobramicina o estreptovidina) que pueden conjugarse a una resina o bolillas magnéticas (Bahn et al., 2012; Peng et al., 2012; Danecek et al., 2012; Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). La identificación global y precisa de proteínas que se purifican conjuntamente con el RNA *target* se puede lograr mediante el uso de espectrometría de masas cuantitativa o no cuantitativa. Avances recientes en las metodologías de captura de RNA han empleado la hibridación con oligonucleótidos complementarios como un método para capturar por afinidad los RNA endógenos y evitar la necesidad de expresar de forma ectópica transgenes marcados. Además, a menudo se agrega una etapa de *crosslinking* para permitir la purificación en condiciones desnaturalizantes, a fin de aislar las interacciones nativas y mejorar la especificidad en la captura de RNA. Utilizando estas técnicas, se han purificado mediante hibridación con oligo *d(T)* el RNA celular poli(A) total junto a las proteínas asociadas directamente a ellos, para la identificación sistemática de proteínas que interactúan con el mRNA, en varios tipos celulares (Guttman et al., 2009; Cabili et al., 2011; Bánfai et al., 2012; Guttman et al., 2013; Guttman and Rinn, 2012; L. Rinn and Chang Y, 2012; Pandit et al., 2013). Los métodos centrados en el RNA también se han utilizado para determinar los complejos asociados con ncRNAs específicos en la célula. De hecho, las composiciones de proteínas de varios complejos de ncRNA, incluidos los de RNA de telomerasa (Lingner and Cech, 2002), pequeños RNA nucleares (*small nuclear RNA*, **snRNA**) (Hartmuth et al., 2002), RNA 7SK (Collins and Hogg, 2007), RNAasa P (Li, 2002) y el lncRNA Xist de mamíferos (Chu et al., 2017; Mchugh et al., 2015) han sido identificados utilizando estos enfoques.

Figura 11. Métodos centrados en RNA para la purificación e identificación de RBPs. (A) Ejemplos de esquemas de purificación de RBPs que utilizan enfoques *in vitro* e *in vivo*. Para los enfoques *in vitro*, se genera una construcción de RNA marcado y se une a un soporte sólido. En este ejemplo, se muestra el método de marcación de interacción RNA- proteína de MS2 con el RNA *target* (rojo), el motivo de unión a MS2 (púrpura) y la proteína MS2 (gris). Se prepara el lisado celular y se capturan las proteínas del lisado utilizando el RNA inmovilizado *in vitro*. Para los enfoques *in vivo*, el RNA *target* está unido por entrecruzamiento a RBPs que interactúan específicamente en células vivas utilizando UV, formaldehído u otros agentes. Las células son lisadas y los complejos RNA-proteína son capturados de la solución. En ambos casos, el complejo RNA-proteína se lava para eliminar las interacciones no específicas (proteínas verdes). Finalmente, se eluyen las proteínas unidas. (B) La espectrometría de masas (MS) se usa comúnmente para identificar las RBP en una muestra purificada. En los enfoques de MS no cuantitativos, las RBP se purifican a partir de material celular no marcado utilizando un RNA de interés o una construcción control. Después de la separación por electroforesis en gel unidimensional, las bandas de proteínas específicas de la muestra se seleccionan, se cortan y se identifican mediante análisis de MS. En los enfoques cuantitativos de la MS, las proteínas se marcan diferencialmente en función de sus poblaciones celulares iniciales. Las purificaciones experimentales y control se realizan en estas poblaciones marcadas y las RBP purificadas se agrupan para crear una sola muestra. El análisis de MS permite la comparación directa de péptidos etiquetados, que luego pueden cuantificarse para determinar las proteínas específicas en la muestra en comparación con el control. Figura adaptada de Mchugh et al. (2014).

4.1 Técnica de purificación por afinidad de ribosomas en activa traducción

(Translating Ribosome Affinity Purification, TRAP)

La técnica de purificación por afinidad de ribosomas en activa traducción (*Translating Ribosome Affinity Purification, TRAP*), desarrollada primeramente en *A. thaliana* (Zanetti et al., 2005), se basa en la expresión de una proteína ribosomal de la subunidad mayor fusionada al epítopo FLAG (un péptido de 8 aminoácidos de secuencia DYKDDDDK). El pequeño tamaño del epítopo FLAG reduce las posibilidades de que éste interfiera con la función biológica de la proteína ribosomal o su incorporación a ribosomas. Asimismo, el epítopo permite la purificación por afinidad de los ribosomas y polisomas intactos utilizando anticuerpos comerciales antiFLAG conjugados a agarosa o a bolillas magnéticas. Gracias a esta técnica fue posible la purificación de polisomas a partir de tejidos de hojas, raíces o flores de *A. thaliana* (Zanetti et al., 2005), y se pudo llevar a cabo el estudio del traductoma (población de mRNAs asociados a polisomas), en plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés ambiental y/o durante distintas etapas del desarrollo de la planta, como así también el análisis de la expresión génica en tipos celulares individuales mediante el uso de promotores específicos de tejido (Jiao and Meyerowitz, 2010). La ventaja que presenta la técnica de TRAP con respecto a, por ejemplo, la ultracentrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, es la capacidad de aislar específicamente aquellos ribosomas que están traduciendo activamente mRNAs sin la contaminación de otros mRNPs con similar coeficiente de sedimentación que puedan cosedimentar con ribosomas y polisomas en una ultracentrifugación diferencial.

En nuestro laboratorio se puso a punto la técnica de TRAP en *M. truncatula*, con el objetivo de cuantificar los cambios en el traductoma en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, tanto en muestras de tejido de raíz total, como en muestras de tejidos de córtex, epidermis o floema utilizando promotores específicos de cada tipo celular (Reynoso et al., 2013a).

4.2 Estudios de expresión génica a escala genómica de leguminosas en simbiosis

En los últimos años, se han evaluado los cambios en el transcriptoma en diferentes etapas de la asociación entre leguminosas y rizobios, ya sea por tecnología de microarreglos de DNA, o por secuenciación masiva de RNAs. Estos estudios permitieron

la identificación de cientos de genes cuyos niveles estacionarios de mRNA aumentan o disminuyen con la infección bacteriana o en los nódulos, en comparación con las raíces no infectadas (Mitra and Long, 2004; Høglund et al., 2009; Libault et al., 2010; Maunoury et al., 2010; Lohar et al., 2006; Moreau et al., 2011; Liu et al., 2019). Sin embargo, los enfoques basados en los niveles estacionarios de transcriptos, no distinguen entre los mRNA que se están traduciendo activamente, almacenando en mRNPs o dirigiendo a degradación. Los genes cuyos niveles estacionarios de mRNA aumentan en presencia de rizobios han sido históricamente seleccionados para realizar ensayos de genética reversa y estudiar su función durante la organogénesis de nódulos o la infección bacteriana, a pesar de que un aumento en los niveles del estado estacionario de un mRNA no se correlaciona necesariamente con un aumento en la abundancia o la actividad de la proteína codificada. Dicho criterio no tiene en cuenta los mecanismos postranscripcionales que contribuyen a la regulación de la expresión génica. Uno de estos mecanismos, que tiene un impacto significativo en la expresión génica, es el reclutamiento selectivo de mRNA para la maquinaria de traducción (Reynoso et al., 2013b) (**Fig. 12**).

En los últimos años, un número creciente de estudios destacó la importancia del control traduccional de la expresión génica durante los procesos de desarrollo, como la germinación de semillas (Basbouss-Serhal et al., 2015), el crecimiento del tubo polínico (Hofmann, 2014) y la floración (Jiao and Meyerowitz, 2010) o la adaptación a estreses ambientales como la sequía (Kawaguchi et al., 2004), hipoxia (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2009; Juntawong et al., 2013a), transiciones luz/ oscuridad (Juntawong and Bailey-Serres, 2012; Missra et al., 2015), estrés térmico (Merret et al., 2017; Zhang et al., 2017) deficiencia de fósforo (Bazin et al., 2017) y patógenos (Meteignier et al., 2017; Xu et al., 2017). En el contexto de la simbiosis formadora de nódulos, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, aunque la traducción no está afectada globalmente, los mRNA específicos que codifican proteínas con funciones en la vía de señalización del NF se reclutan selectivamente en polisomas en etapas tempranas de la interacción (Reynoso et al., 2013a).

La regulación traduccional de los genes involucrados en esta cascada se analizó en el momento de la formación del IT y la activación de la división de las células corticales

(Reynoso et al., 2013a). Este análisis reveló que los genes que codifican las proteínas RLKs NFP, DMI2 y CRE1 estaban regulados positivamente en la respuesta a los rizobios, a pesar de que se observaron cambios leves o nulos en el nivel basal de mRNA. Otro grupo de genes que mostró una regulación positiva significativa a nivel de traducción incluye aquellos que codifican los factores de transcripción de la familia *GRAS*, *NSP1* y *NSP2*, y dos subunidades del complejo transcripcional NF-Y, *NF-YA1* y *NF-YA2*. Se observó una fuerte coregulación traduccional exhibida por *NSP1* y *NSP2*, cuyos productos forman un heterodímero que se une y activa la expresión del promotor *ENOD11*, y por *NF-YA* y *NF-YC*, que codifican componentes del mismo complejo transcripcional. Otros genes, como *LYK3*, *DMI3*, *IPD3* y *LIN* (que codifica una ubiquitina E3 ligasa) no muestran ninguna evidencia de regulación positiva ni a nivel transcripcional ni traduccional. A pesar de esto, el análisis de mutantes ha mostrado que estos genes desempeñan funciones cruciales durante la formación de nódulos y/o en la infección bacteriana. Esta observación podría explicarse si suponemos que los productos funcionales codificados por *LYK3*, *DMI3*, *IPD3* y *LIN* estén regulados a nivel post-traduccional. En concordancia con esta hipótesis, un trabajo de 2011 ha demostrado que se requiere la autofosforilación del receptor *LYK3* para su funcionalidad en la formación de nódulos (Klaus-Heisen et al., 2011). Otro grupo de genes, como *ENOD40* y los factores de transcripción *ERN1* y *NIN*, mostraron regulación transcripcional y traduccional homodireccional, es decir, un aumento similar en su abundancia a nivel de RNA total y en su asociación con polisomas en respuesta a rizobios. *DMI1* fue el único gen analizado que mostró una regulación heterodireccional negativa en la infección bacteriana (aumentó a nivel del RNA total, pero disminuyó en su asociación con polisomas). Esta transcripción podría representar una categoría de mRNA que, tras la infección rizobiana, aumenta su velocidad de síntesis o estabilidad, pero una vez en el citoplasma se almacenan en complejos de mRNP (Reynoso et al., 2013b).

Figura 12. Regulación traduccional de los genes involucrados en la vía simbiótica de nódulo de raíz. Los transcritos de 15 genes implicados en las respuestas de las células corticales y epidérmicas a los rizobios se clasificaron en función de la proporción del cambio en la muestra de RNA de TRAP en relación con el cambio en la muestra de RNA total, que se indica en una escala de color definida desde 0 (amarillo) a 4 (rojo). Los mRNA que mostraron relaciones (tasas de cambio en TRAP) / (tasas de cambio en RNA total) > 2 se consideraron regulados positivamente (*UP* regulados) a nivel de traducción y se presentan en naranja oscuro y rojo. Esta categoría incluye los mRNA que codifican tres RLK (NFP, DMI2 y CRE1) y cuatro TF (NSP1, NSP2, NF-YA y NF-YC). Los transcritos que muestran relaciones entre 0,5 y 2 se consideraron no regulados a nivel de traducción y se presentan en amarillo oscuro o naranja claro. Esta categoría está representada por 6 transcritos que codifican proteínas con diversas funciones (LYK3, DMI3, la ubiquitina E3 ligasa LIN, y los TFs ERN1, IPD3 y NIN) y por el RNA de ENOD40, altamente estructurado. La tercera categoría incluye sólo un mRNA (que codifica el canal iónico DMI1), que mostró una relación $< 0,5$ y, por lo tanto, se considera regulada negativamente (*Down* regulado) a nivel de traducción y se presenta en amarillo.

4.3 Técnica de inmunoprecipitación de RNPs (*RNPs Immuno Precipitation, RIP*)

La técnica denominada inmunopurificación de RNPs (*RIP* por sus siglas en inglés) es un método centrado en proteínas componentes de RNPs para la detección de interacciones RNA- proteína. Como todos los métodos de esta clase descritos en la **Fig. 10**, RIP se basa principalmente en tres factores: (1) la disponibilidad de un anticuerpo o suero que reconoce específicamente una proteína que integra un RNP, (2) un procedimiento de extracción que mantenga la interacción mRNA-proteína, y (3) un método eficiente para separar los complejos de interés de otras proteínas y RNAs en el extracto.

La técnica RIP se ha empleado con éxito para purificar complejos de RNP a partir de extractos de tejidos vegetales, identificar los RNA *target* y demostrar las asociaciones RNA- RNP a nivel global, su dinámica y la dependencia del tratamiento analizado (Sorenson and Bailey-Serres, 2014; Juntawong et al., 2013b; Ji et al., 2011; Schmitz-Linneweber, 2005). Las asociaciones RNP-RNA pueden identificarse a partir de complejos RNP involucrados en procesos de RNA muy conservados (por ejemplo, interacciones ribosoma-mRNA), así como en procesos especializados que son activos en

una célula, tejido específico, condición o en una especie única (Mustroph et al., 2009). Además, el método es aplicable a los RNP, independientemente de si la interacción ocurre en una ubicación subcelular específica (núcleo, citoplasma, retículo endoplasmático (ER) asociado a la membrana, mitocondria o plastidio). El ensayo RIP se basa en una simple etapa de purificación por afinidad basada en bolillas o resinas que aprovechan la interacción específica entre un anticuerpo y su antígeno (es decir, el epítopo). De manera similar, se puede utilizar una proteína marcada con biotina que es reconocida por estreptavidina. Así, la técnica RIP permite el enriquecimiento de moléculas de RNA asociadas establemente a RBPs que luego pueden ser separadas y extraídas para su identificación, ya sea por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (**RT-qPCR**), análisis de microarreglos de DNA, o secuenciación masiva de RNA (**RNA-Seq**).

En este trabajo, nos enfocamos en emplear la técnica RIP sobre las proteínas RBP47, UBP1, DCP1 y XRN4, descritas anteriormente, que integran los mRNPs citoplasmáticos PBs y SGs, en el contexto de la interacción simbiótica en etapas tempranas entre *M. truncatula*-*S. meliloti*.

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis y Objetivo general

Nuestra hipótesis de trabajo es que los mecanismos que determinan la localización citoplasmática de los mRNAs contribuyen a la regulación de procesos biológicos de importancia agronómica como la nodulación. Este nivel de regulación ha sido poco tenido en cuenta en los enfoques tradicionales, que se han centrado en la diferencia en los niveles estacionarios de mRNA para seleccionar los genes que participan en programas de desarrollo o respuesta a estímulos ambientales. Dicha hipótesis encuentra sustento en los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, donde se observó que un porcentaje importante de los genes de nodulación identificados mediante genética no varían sus niveles de mRNA, pero si su asociación a polisomas en respuesta al rizobio (Reynoso et al., 2013a).

Por su parte, la evidencia de una eficiencia traduccional diferencial de ciertos mRNAs en presencia de rizobios simbioses en *M. truncatula*, y la transcripción diferencial de genes de *P. vulgaris* relacionados con la selectividad de cepas más eficientes de *R. etli* que coevolucionaron en un mismo centro de diversificación genética (Aguilar et al., 2004), hace pensar que los mRNA regulados en estos procesos tienen características intrínsecas comunes que permiten ser objeto de regulación y distribución por parte de la célula.

El objetivo general del trabajo es estudiar la distribución dinámica de mRNAs en diferentes complejos ribonucleoproteicos (RNPs) citoplasmáticos durante un proceso biológico de alto impacto agronómico como la FBN, qué aporte hacen los SGs y los PBs sobre la regulación postranscripcional de los genes implicados en la vía del NF, y qué características presentan los mRNAs que son regulados en este proceso biológico complejo.

2. Objetivos específicos

Para abordar el objetivo general planteado, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1- Obtener plantas transgénicas de *M. truncatula* que expresen un componente de los complejos de mRNPs asociados a degradación (DCP1 o XRN4), o almacenamiento (RBP47 o UBP1) de mRNAs, fusionado a un epítopo FLAG.

2- Aislar mRNA a partir de inmunopurificaciones de los complejos de mRNPs SGs y PBs.

3- Correlacionar la estructura de los mRNAs (longitud, estructura del 5' UTR, CDS y 3'-UTR, secuencias consenso) con los cambios en la eficiencia traduccional que presentan algunos mRNA frente a la inoculación de *M. truncatula* con *S. meliloti*.

4- Correlacionar la estructura de los mRNAs en *P. vulgaris* (longitud, contenido GC, estructura del 5' UTR y 3'-UTR, secuencias consenso), y la presencia de elementos regulatorios sobre los promotores, con la capacidad de selección de cepas de *R. etli* más eficientes para la nodulación.

Capítulo I

*Puesta a punto de la técnica de
inmunoprecipitación de complejos
ribonucleoproteicos citoplasmáticos
en M. truncatula: evaluación de
genes de la vía de señalización del
factor Nod*

Resultados y Discusión

En este capítulo abordaremos los primeros dos objetivos específicos propuestos en la presente Tesis Doctoral. Describiremos la obtención de las construcciones utilizadas para expresar proteínas que componen los *P-Bodies* (PBs) o gránulos de estrés (SGs), la transformación de las raíces de *M. truncatula*, la técnica de RIP para inmunopurificar los RNAs asociados a PBs o SGs y, por último, la extracción y el análisis de los mRNAs asociados a PBs o SGs a partir de muestras RIP del tejido transformado.

1. Búsqueda de secuencias codificantes, clonado y obtención de las construcciones para la sobreexpresión de proteínas de PBs y SGs

Como primer paso, se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de seleccionar las proteínas que conforman los PBs y SGs candidatas a ser expresadas en *M. truncatula*. Para la selección de estas proteínas se tuvo en cuenta que las mismas sean componentes exclusivamente de uno de los complejos mRNPs mencionados y tengan capacidad de unirse a mRNA (RBP). A su vez, y teniendo en cuenta que los grandes avances en la descripción de estos mRNPs se han llevado a cabo principalmente en levaduras y en mamíferos, se realizó una búsqueda de aquellas proteínas que se encuentran conservadas en diferentes reinos y/o que hayan sido utilizadas en otras especies para la inmunopurificación de PBs y SGs. En base a los criterios mencionados, se seleccionaron las proteínas DCP1 y XRN4 como componentes de los PBs, y UBP1 y RBP47 como componentes de SGs (Weber et al., 2008; Sorenson and Bailey-Serres, 2014; Rymarquis et al., 2011).

DCP1 es un componente del complejo proteico de remoción del 5' CAP en los mRNAs que luego serán degradados por exorribonucleasas que actúan en sentido 5'-3', como es el caso de la exorribonucleasa XRN4 en plantas (Xu et al., 2006; Weber et al., 2008; Souret et al., 2004; Potuschak et al., 2006). Esta vía citoplasmática de degradación de los mRNA requiere la previa deadenilación de la cola poli (A), la cual ocurre principalmente en PBs. Tanto la vía de degradación como los componentes de los PBs se encuentran evolutivamente conservados, pudiendo hallarlos en levaduras y mamíferos, como así también en plantas (Coller and Parker, 2004; Xu et al., 2006; Kastenmayer and Green, 2000).

El ensamblado de SGs en células de mamífero en condiciones de estrés depende de dos proteínas denominadas TIA1 y TIAR (Kedersha et al., 1999). UBP1 es la proteína

vegetal con mayor porcentaje de identidad a estas dos proteínas (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). UBP1 se expresa constitutivamente y está conservada en el genoma de diversas plantas. En el núcleo de células vegetales, UBP1 se encuentra asociada a secuencias poliadeniladas de mRNAs. Además, se ha demostrado que esta proteína representa una pieza clave en el ensamblado de SGs en el citoplasma de protoplastos vegetales bajo condiciones de estrés térmico (Sorenson and Bailey-Serres, 2014).

RBP47 es una proteína acompañante de ciertos mRNAs en el citoplasma. En condiciones de estrés se concentra en SGs junto a otras proteínas características de estos gránulos, por ejemplo UBP1 (Weber et al., 2008). RBP47 y UBP1, junto a RBP45 y RZ-1 (Hanano et al., 1996) son las únicas proteínas vegetales caracterizadas *in vivo*, que interaccionan con el poli (A) de los mRNA en núcleo (Lorkovic et al., 2000). RBP47 también ha sido localizada en el núcleo formando parte del complejo de *splicing* de los pre mRNAs (Lorkovic et al., 2000).

Se utilizaron las secuencias de las proteínas RBP47C (Sorenson and Bailey-Serres, 2014; Lorkovic et al., 2000), UBP1 (Sorenson and Bailey-Serres, 2014), DCP1 y XRN4 (Weber et al., 2008) de *A. thaliana* descritas en trabajos previos, para la búsqueda de los genes ortólogos putativos respectivos en el genoma de *M. truncatula*. Se utilizó la herramienta BLASTN para la búsqueda de regiones homólogas en la versión Mt4.0v1 del genoma de *M. truncatula* disponible a través del sitio web *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (Tabla 1).

Se encontraron dos genes que codifican proteínas anotadas como RBP47C (Medtr3g101370; Medtr1g020080). Las regiones codificantes de ambos genes presentaron un 72,9 % de identidad en la secuencia nucleotídica con RBP47 de *A. thaliana* (AT1G47500), mientras que a nivel de aminoácidos las identidades de secuencia de Medtr3g101370 y Medtr1g020080 con la proteína RBP47 de *A. thaliana* fueron del 67,5 % y 66,9 %, respectivamente. Además, Medtr3g101370 presentó un mayor valor de *score* (273,6) y un menor *e-value* ($3,1 \cdot 10^{-71}$) que Medtr1g020080 (262,8; $5,5 \cdot 10^{-68}$, respectivamente). En base a este análisis, se seleccionó el gen Medtr3g101370. La proteína codificada por dicho gen se denominó Mtr-RBP47 y la secuencia de aminoácidos de la misma fue alineada a la correspondiente de *A. thaliana*. En dicho alineamiento pueden observarse los tres motivos RRM de reconocimiento de RNA, los cuales se encuentran conservados en ambas especies (Fig. 13A).

La búsqueda de BLASTN utilizando la secuencia de UBP1 de *A. thaliana* (AT3G14100) como *query* y la base de datos genómica de *M. truncatula* arrojó coincidencias con dos genes anotados como codificantes de proteínas nucleolysin- TIAR like: Medtr8g022050, y Medtr4g124940. Medtr8g022050 presentó un porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos mayor al 80% con la región codificante de AT3G14100, el cual resultó superior al 78,9 % exhibido por Medtr4g124940. Medtr8g022050 también presentó mayor porcentaje de identidad en las comparaciones a nivel de secuencia de aminoácidos: un 80,25 %, muy superior al 67,95 % que presentó Medtr4g124940. Además, la proteína codificada por Medtr8g022050 posee el mismo número de aminoácidos que UBP1 de *A. thaliana*, mientras que la proteína codificada por Medtr4g124940 es 23 aminoácidos más corta. A partir de este análisis, se seleccionó la proteína codificada por Medtr8g022050, la cual se denominó Mtr-UBP1. Esta proteína también posee conservados los tres motivos de reconocimiento a RNA RRM (**Fig. 13B**).

La búsqueda de genes de *M. truncatula* que presenten homología al gen *XRN4* de *A. thaliana* (AT1G54490) arrojó un único match con el gen Medtr7g114570 con un porcentaje de identidad de 75,5 % a nivel de nucleótidos y 68,6 % a nivel de la secuencia aminoacídica. Dicho gen, Medtr7g114570, fue anotado como un gen codificante para una exorribonucleasa 5'- 3' ya que posee el dominio catalítico conservado en exonucleasa 5' - 3' (**Fig. 13C**).

Por último, la búsqueda de BLASTN utilizando como *query* la secuencia del gen *DCP1* de *A. thaliana* (AT1G08370) arrojó dos resultados: Medtr2g086970, y Medtr7g105250, ambos anotados como genes que codifican *mRNA-decapping enzyme- like protein*. El gen Medtr7g105250 presentó un *score* de 154,6, y un *e-value* de $1,3 \cdot 10^{-35}$, mientras que el gen Medtr2g086970 mostró un *score* de 140 y un *e-value* de $2,9 \cdot 10^{-31}$. Sin embargo, Medtr2g086970 posee solamente 1 aminoácido menos que la proteína codificada por el gen de Arabidopsis (366 y 367 respectivamente), mientras que Medtr7g105250 codifica una proteína de sólo 348 aminoácidos. Además, el porcentaje de identidad en aminoácidos de la proteína codificada por Medtr2g086970 fue 64,7 % (**Tabla 1**), mientras que la codificada por Medtr7g105250 presentó sólo 59,7% de identidad, respecto de DCP1 de *A. thaliana*. A partir de este análisis se seleccionó la proteína codificada por el gen Medtr2g086970, a la cual se denominó Mtr-DCP1. Dicha proteína

al igual que su contraparte de Arabidopsis, posee el dominio catalítico con actividad de remoción del *cap* conservado en diferentes especies (*decapping*, Fig. 13D).

Tabla 1. Porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los genes que codifican las proteínas RBP47, UBP1, DCP1 y XRN4 en *A. thaliana* con sus homólogos en *M. truncatula*. Las comparaciones de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se realizaron utilizando las herramientas BLASTN y BLASTP, respectivamente.

Proteína	Identificación del gen en <i>A. thaliana</i>	Identificación del gen en <i>M. truncatula</i>	% de Identidad de secuencias nucleotídicas	% de Identidad de secuencias de aminoácidos
RBP47	AT1G47500.1	Medtr3g101370.1	72,9	67,5
UBP1	AT3G14100.1	Medtr8g022050.1	78	80,2
DCP1	AT1G08370.1	Medtr2g086970.1	79,2	64,7
XRN4	AT1G54490.1	Medtr7g114570.1	75,5	68,6

En general, los alineamientos de bases nucleotídicas presentan menor porcentaje de identidad que los alineamientos de aminoácidos, principalmente por la degeneración del código genético, y por la mayor presión de selección evolutiva que sufren las proteínas, ya que su función biológica depende de su conformación espacial dada por sus aminoácidos constituyentes. Sin embargo, a excepción de UBP1, tanto RBP47 como DCP1 y XRN4 presentaron porcentajes de identidad de bases nucleotídicas mayores a los alineamientos de aminoácidos.

A

Mtr-RBP47C	1	-----MQS-----NGSDSKETEQSSNNRPPQKTPPPSPH-----SLTFPPPPQWVPMQYF
Ath-RBP47C	1	MADVKTQSESESSDSHFV---VDNQPPPPPPPPQQAKEEENQFKTSPTPPPHW--MRYF
Mtr-RBP47C	48	FAAMVMPHMM--PQHVPFPPFHHYMAVHHYLHHVP--HVVHGSSAADNKTITWVGDLLHWM
Ath-RBP47C	56	HTVIT--TPHQMNYAPPPFP--PYHQMNP--HHHLHHQSRGNKHONAFNGENKTIWVGDLLHWM
Mtr-RBP47C	105	DENYLHRCFAST--GEIFSISKVIRNKQTCQIEGYGFVEFTSHGTAKVLQTYAGMLMPNT
Ath-RBP47C	113	DEAYLNSSFASGDREIVSVKQVIRNKQNGLEGYGFVEFTSHDVAQKVLRENGTTPMPNT
RRM1		
Mtr-RBP47C	163	EQPFRLNWAFSTGDKHRSQNPDLISIFVGDIAADVDTMLLETFSIKYPSVKAARKVVF
Ath-RBP47C	173	EQPFRLNWAFSTGDKHLENNGPDLISIFVGDLSFDVSDNLLHETFSIKYPSVKAARKVVF
RRM2		
Mtr-RBP47C	223	ANTGRSKGYGFVREGDIGERSKATNEMNGVFCSSRAMRIGATPRKESGYQQGGQ--SNG
Ath-RBP47C	233	ANTGRSKGYGFVREGDENERTKAMTEMNGVKCSSRAMRIGATPRKNGYQQGGGYMPNG
Mtr-RBP47C	281	TPSQSDTIDSTNTTIFVGGLDPSATAEDLRQPFQYGEIVSVKIPVKGKCGFVQFANRNNA
Ath-RBP47C	293	TLTRPFGIIMNTTIFVGGLDSSVTDEDLRQPFNEGEIVSVKIPVKGKCGFVQFVNRPNNA
RRM3		
Mtr-RBP47C	341	EEALQKLNGTIVGKQTVRLSWGRNPANKQERSEFGSEFWNGPAYYGCPAYDCYGYAMFHFV
Ath-RBP47C	353	EEALEKLNGTIVGKQTVRLSWGRNPANKQERDKVGNQWVDF--YYGGQFYNGYGYMVFQDF
Mtr-RBP47C	401	DQSMY-AAAAPMYGGHQQQVS*
Ath-RBP47C	412	PRMYPAAAPYPMYGGHQQQVS*

B

Mtr-UBP1	1	MQN ER LMKQ Q Q Q H Q H Q Q Q Q Q AMMQ Q AL Q Q Q SLYHPGLAPP Q LEP TP SGNLPPGFDPST
Ath-UBP1	1	MQN ER L --- K Q H Q Q Q Q Q AMMQ Q AL Q Q Q SLYHPGLAPP Q LEP TP SGNLPPGFDPST
Mtr-UBP1	61	CRSVYVGN V HTQVTEPL Q EV FA GTGPVE G CK LE RKEKSSYG F IHYFDRRSAALAIL TLN
Ath-UBP1	58	CRSVYVGN V HTQVTEPL Q EV FT STGPV ES KL LR KKSSYG F VHYFDRRSAALAIL TLN
RRM1		
Mtr-UBP1	121	GRHLFGQPIKVNWAYAS G QREDT S CHYNI F VGDLSP E VTDAT L FA CF SVY Q SCSDARVMW
Ath-UBP1	118	GRHLFGQPIKVNWAYAT G QREDT S SHENI F VGDLSP E VTDAT L Y Q S FS V ES SCSDARVMW
RRM2		
Mtr-UBP1	181	DQKTGRSRGFGFVSFR S Q Q DAQ S AIND L TGKWLGS R QIRCNWATKGAGGI EE K Q NSDS KS
Ath-UBP1	178	DQKTGRSRGFGFVSFR N Q Q DAQ T AINE M NGKWLGS R QIRCNWATKGATSG DD KLSD GS
Mtr-UBP1	241	VVELTNGSSE D GKE I SSND V PENN P QYTTVYVGNLGS E ATQ LD LHR H FHALGAGVIEEVR
Ath-UBP1	238	VVELTTGSSE D GKE T LNE ET PENN S QFTTVYVGNL AP EV T Q LD LHR Y FHALGAGVIEEVR
RRM3		
Mtr-UBP1	301	VQ RD KGFGEVRY S TH EA ALAIQMGNA S SY LC GI IK CSWG S SKPTPPGTASNPLPP AAA
Ath-UBP1	298	VQ RD KGFGEVRY N TH EA ALAIQMGNT Q PY LE NR Q IKCSWG N SKPTPPGTASNPLPP APA
Mtr-UBP1	361	PI P GLS AT DI L AYERQLAMSKMG V HAAL M HP QA QHPL QA --- AI GA S QA I YDGGF Q N
Ath-UBP1	358	PI P GLS AA DI L NYERQLALSKMAS V N- AL M H Q Q QHPL QA HG I NA GA TA AM YDGGF Q N
Mtr-UBP1	417	VAA AA Q Q MMYY Q *
Ath-UBP1	417	VAA AA Q Q MMYY Q *

C

Mtr-XRN4	1	MGVPAFYRWLADRYPSISIDVVVEEAFSPSVLGGPPFPVDVSRPNPNGMEFDNLYLDMNGI
Ath-XRN4	1	MGVPAFYRWLADRYPKSISIDVVVEEFPIDGG-RGDLIPVDITRPNPNGMEFDNLYLDMNGI
Mtr-XRN4	61	IHPCFHPGCKPAPATYDDVFKSMFYIDHLESLVRPRKILYLAIDGVAPRAKMNQQRSR
Ath-XRN4	60	IHPCFHPGCKPAPATYDDVFKSMFYIDHLESLVRPRKILYLAIDGVAPRAKMNQQRSR
Exonucleasa 5' – 3'		
Mtr-XRN4	121	FRAAKDAAEAEEERLRNEFADQIEHLTSKERKETHDSNVITPGTPFMAILSVALQYYI
Ath-XRN4	120	FRAAKDAAEAEEERLRKDFEMEGQILSAKEKAEITCDSNVITPGTPFMAILSVALQYYI
Mtr-XRN4	181	QRLNYPGWNTKVMLSDSNVFGEGEHKIMDYIRLQRLNPGFDPNTRHCLYGLDADLIM
Ath-XRN4	180	QRLNHNPGWRYVKVILSDSNVFGEGEHKIMSYIRLQRLNPGFDPNTRHCLYGLDADLIM
Mtr-XRN4	241	LSIATHEWHFSILREVITPGQOEKCYMCGVGHIAECRGKPGDNALDWLVDTPIHKK
Ath-XRN4	240	LSIATHEWHFSILREVITPGQOEKCFVCGGTGHFASPCFGKSCSNNA---AADIPIHKK
Mtr-XRN4	301	KYQFTHIWVLELYLQYELIIPDPPEIDFERIIDDVFVLCFFVGNDFLPHMPTLEIREGA
Ath-XRN4	297	KYQFINIWVLELYLQYELIIPDPPEIMINFERIIDDVFVLCFFVGNDFLPHMPTLEIREGA
Mtr-XRN4	361	VNLLMHVYRKEFTAMGGYLTDAEVLRLRVENFIQVAVHEQIFQKRVRIQQSQDINEG
Ath-XRN4	357	VNLLMHVYRKEFTAMGGYLTDSCEVLLRVBHFICQAVAVNEKIFQKRVRIKQSMINNEG
Mtr-XRN4	421	MRARARGMPPEERASVVDKVKLGCPGYTERYYAEKHGASDPE--TERIKKDIVLKYVEGL
Ath-XRN4	417	MNQRSRRTPESEVPEPTIDDKIKLGPBGYKERYAAEKSTINPEETEQLKQDMVLKYVEGL
Mtr-XRN4	480	CWVCYYYQGVCSWQWYYPHYAPFASDLKDLADLEITFFMGEPFPDFDQLMGTLFSSSS
Ath-XRN4	477	CWVCYYYQGVCSWQWYYPHYAPFASDLKDLADLEITFFMGEPFPDFDQLMGTLFAASS
Mtr-XRN4	540	SALPERYRDLINPSSPIIKFYPSDFEIDMNGKYSWQGWAKLPFIDEKKLLSATRILEG
Ath-XRN4	537	NALPEYRKILMTDSSPIIKFYPADFEIDMNGKREAWQGLAKLPFIDEKLLLAATRKLEE
Mtr-XRN4	600	TLTVEECIRNSKMLDLLYVSRARHIVPFIIEYYQNYSHLEHQORPVLFIDESASDGMNGF
Ath-XRN4	597	TLTVEECQIRNSVMLDLLYVRAPHPGQRIICYYHFYQHMEPHECLFWMIDENSQGMNGF
Mtr-XRN4	660	LWSYERNVFRIVSSPTKGLQDIACNOVLNTYILNERTRHHTPKPEDSVVMFQKITRAITL
Ath-XRN4	657	LWFSERNVFRIVSSPWNGLPCIEQNRALNTYILCPAKSHHSEPPRCALITPDKILTSVD
Mtr-XRN4	720	IKPLEVLWHEDNSR-RHQARERQVVGAIAGPOLGEAAHRLVRNSLQFNNNTSYPDQF--
Ath-XRN4	717	IKPEFPLWHEDNSNRHQARDREQVVGAIAGPOLGEAAHRLIKNTLNMKSSTGAASGLID
Mtr-XRN4	777	-----FS-----HTNRRVPTGASGSGKYVGESSGYGQNYNPQGMTRPRFPFIASN
Ath-XRN4	777	PNGYYRNVPGNYSYGGVNRPRAPGESPYRKAYDDSSYYGKYNNSTQGTNNNGPRYPYP
Mtr-XRN4	826	GWQNDRONIRIDDSQHHEQTHNMKTGFQALTDEGVRPRSSAIPSPKTPAMMLMRPONS
Ath-XRN4	837	SNGSQDYNRNYSIVAEQH-NRGGLGAGMSGUSIEDNGRSKQIY-----SSY
Mtr-XRN4	886	GHTTNLQPFQVQNI GPETEPENWISKAPDTNGM--YARHQAAGVGSAYDKPIK-KVYQIK
Ath-XRN4	884	TEAANAN-----LNPLESPPTQWICTQPGGNFVGQYYRDCVG-YSETNGKSVKKVIYQ
Mtr-XRN4	943	TINPQDMPEQGNQW*--
Ath-XRN4	936	ATIQPS----HRGANL*

D

Mtr-DCP1	1	MSQNGKLMENLDQOSTKLLNLTVLQRIDPFVEEILITAAHVTFYEFNI	LSQWSRKDVEG
Ath-DCP1	1	MSQNGKIIPNLDQNSTLLNLTVLQRIDPFVEEILITAAHVTFYEFNI	LSQWSRKDVEG
<hr/>			
Mtr-DCP1	61	SLFVVKRNTQPRFQFIVMNRNTENLVENLLGDFEYE	QVPLYLYRNAQOEVNGIWFYNA
Ath-DCP1	61	SLFVVKRSTQPRFQFIVMNRNTENLVENLLGDFEYE	QVPLYLYRNAQOEVNGIWFYNA
<hr/>			
Decapping			
Mtr-DCP1	121	RECEEVANLFSRILNAYAKVPPKLVSSTKSEFEELEAVPTMAVMDGPLEPSS	ITSNVA
Ath-DCP1	121	RECEEVATLFRILNAYSQVKNQKPKASSKSEFEELEAVPTMAVMDGPLEPSS	----AR
<hr/>			
Mtr-DCP1	181	DVPDDPSFNFSSAAMGIGNTSNPIGOPYOSSATISSSGPTHAAIPVVP	PTLQ----
Ath-DCP1	177	DAPDDPAFNFSSSTNIGNTASASAG-PYOSSAIPHQPHQPHQPTIAEPVAAA	PPQI
<hr/>			
Mtr-DCP1	237	--IPSLPSTSTFTTP-QHDAPESSINS--SQATNLVKPSFFVPELSSAAMMPVSS	PTA
Ath-DCP1	236	QSPPELQSSPLMTLFDNNPEVSSNSNIHDLVTPSFFGPERMMAQPHIP-GVSMPTA	
<hr/>			
Mtr-DCP1	293	PPLHETG--TVQRPYGTPLQFPFPPTPPPSLAPVSSPLPNEAISREKVRDALVLQDN	
Ath-DCP1	295	PPLNENNAHQORSYGTPEVLPFPFPPTPPPSLAPAP---TGEVISRKVKKEALISLQED	
<hr/>			
Mtr-DCP1	351	CFIDMYYKALLNAHQ*	
Ath-DCP1	352	EFIDKITETLQNALQO*	

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RBP47 (A), UBP1 (B), XRN4 (C) y DCP1 (D) de *M. truncatula* (Mtr) y *A. thaliana* (Ath). Los alineamientos de secuencias de aminoácidos se realizaron utilizando el algoritmo *ClustalW*. Los aminoácidos idénticos fueron sombreados en negro, mientras que los aminoácidos conservados se marcaron en gris utilizando el programa *BOXSHADE*. Los dominios proteicos característicos de cada proteína se destacan subrayados con una línea negra. En (A) y (B) se indican los tres motivos de reconocimiento de RNA (RRM- *RNA Recognition Motif*); en (C) el dominio catalítico con actividad exonucleasa 5'-3', y en (D) el dominio catalítico con actividad de remoción del cap (*decapping*).

A partir de los genes seleccionados (Tabla 1) se diseñaron *primers* para amplificar por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por *Polymerase Chain Reaction*) el marco abierto de lectura de las cuatro proteínas, utilizando como templado muestras de cDNA obtenidas a partir de tejido de raíces de *M. truncatula* wt. Las secuencias de los *primers* se detallan en la sección 11 de Materiales y Métodos. A los *primers* diseñados se les adicionaron cuatro bases con la secuencia CACC sobre el extremo 5' para permitir el clonado direccional en el vector de entrada al sistema Gateway pENTR/D-TOPO (Invitrogen), el cual contiene la secuencia complementaria GGTG. Los productos de amplificación por PCR fueron introducidos inicialmente en el vector pENTR/D-TOPO y luego transferidos a un vector de expresión mediante recombinación específica de sitio tal como se indica en la sección 2.7 de Materiales y Métodos. Brevemente, la tecnología de Gateway consiste en una reacción de recombinación en sitios específicos tomados del bacteriófago *lambda* para obtener rápida y eficientemente el producto de interés

direccionado en un vector de expresión (Landy, 1989). Estos sitios específicos de recombinación se denominan *attL1* y *attL2* en los vectores de entrada como el pENTR/D-TOPO, y *attR1* y *attR2* en los vectores de destino (**Fig. 14**) y la reacción de recombinación entre dichos sitios requiere de la enzima LR clonasa.

Figura 14. Esquema del vector de expresión *p35S-GAT-FH* utilizado para la transformación de raíces de *M. truncatula*. **A.** Vector de expresión utilizado para expresar proteínas fusionadas a un epítopo FLAG y un epítopo de 6 histidinas (FH) (Zanetti et al., 2005). En el esquema se muestra en detalle la secuencia de aminoácidos del epítopo FLAG (DYKDDDDK), un separador de tres glicinas y una serie de 6 histidinas (*His6*), y se marca la posición de la secuencia 5' no traducida Ω del virus del mosaico del tabaco (5' Ω). Se muestran tres construcciones: el vector vacío *p35S:GAT-FH* (**B**) y las construcciones denominadas *p35S:RBP47-FH* y *p35S:DCP1-FH* para la sobreexpresión de las proteínas RBP47 (SGs) y DCP1 (PBs), respectivamente (**C**). Las flechas en (**C**) marcan la posición de los *primers* *RBP47fw* y *DCP1fw* en color marrón, mientras que en negro se destacan los *primers* *RBP47 fw-int* y *DCP1 fw-int* (correspondientes a posiciones internas del marco abierto de lectura de cada proteína), y su par 3'*ocs-rv* en sentido opuesto sobre la secuencia del extremo 3'*ocs*. Se realizaron construcciones similares para el marco abierto de lectura de la proteína UBP1 (no mostrado).

El vector utilizado para la expresión de las proteínas se denomina *p35S:GAT-FH* (**Fig. 14 A**) (Zanetti et al., 2005). Este vector consta del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor completo (*CaMV 35S*), seguido de la secuencia 5' no traducida Ω del virus del mosaico del tabaco (5' Ω). A continuación, se encuentra el sitio de inicio de la traducción seguido por una región que codifica para un espaciador de 7 glicinas, un epítopo conteniendo la secuencia FLAG (*FLAG*), un espaciador de tres glicinas y seis residuos de histidina (*His6*). Esta unidad transcripcional termina con la región 3' no

traducida del gen de la octopina sintasa (3' *ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens*. Este vector posee también el gen *nptII*, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Km^r) para la selección de las plantas transformadas.

Se decidió expresar las proteínas fusionadas a los epitopes FLAG-His6 en su extremo carboxi-terminal (Ct) ya que los sitios activos de UBP1, XRN4 y DCP1 se encuentran próximos al extremo amino terminal (Nt). Se quitaron los codones de terminación (*STOP*) de los marcos abiertos de lectura en el diseño de los *primers reverse* para generar la fusión a los epitopes. El vector de destino *p35: GAT-FH* posee además el *cassette Gateway* ubicado entre el 5'Ω y el espaciador de siete glicinas. Este *cassette Gateway* consta del gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^R) y el gen *ccdB*, un inhibidor de la DNA girasa de *E. coli*, flanqueados por los sitios de recombinación del fago lambda *attR1* y *attR2* (**Fig. 14 A**). Luego de la recombinación utilizando la enzima LR clonasa se obtuvieron las construcciones que llevan el ORF de *RBP47*, *UBP1*, y *DCP1*, las cuales se denominaron *p35S:RBP47-FH*, *p35S:UBP1-FH* y *p35S:DCP1-FH* respectivamente (**Fig. 14 C**). A su vez se trabajó con el vector vacío *p35S:FH* como control, el cual no contiene el *cassette Gateway*. La construcción *35S:XRN4-FH* no se pudo obtener, posiblemente debido a la dificultad de introducir fragmentos grandes en vectores de clonado de tamaño similar o más pequeños que el inserto. El fragmento obtenido por amplificación de XRN4 contiene 2871 pares de bases (**pb**), mientras que el vector de clonado pENTR/D-TOPO tiene un tamaño de 2580 pb. Por su parte, no se continuó trabajando con la construcción *35S:UBP1-FH*, debido a que el diseño de los *primers* original fue realizado con una secuencia de 1170 pb disponible en la versión 3.5 del genoma. Sin embargo, luego de la actualización a la versión 4.0v1, ocurrida durante el transcurso de esta tesis, incluyó un cambio en la secuencia de este gen que indicó que el fragmento obtenido por amplificación contenía una versión truncada de la proteína UBP1 (la región codificante en esta versión era de 1284 nts). Es por ello que, para lograr la expresión de la proteína completa, se deberán rediseñar los *primers* de acuerdo a la versión actualizada del genoma de referencia. Entonces, a partir de aquí, los siguientes resultados serán descriptos para las construcciones que sobreexpresan RBP47 como marcador de SGs, y DCP1 como marcador de PBs.

Una vez confirmado por secuenciación capilar que las construcciones portaban las secuencias codificantes de las tres proteínas, y se encontraban en la orientación correcta

y en fase con el epítopo FLAG-His6, las mismas fueron introducidas en *Agrobacterium rhizogenes* ARQUA1 mediante electroporación, para ser utilizadas posteriormente en la transformación de raíces de *M. truncatula*.

2. Expresión de las proteínas DCP1 de PBs y de RBP47 de SGs en raíces de *M. truncatula*

Con el objetivo de expresar las proteínas DCP1 y RBP47 en raíces de *M. truncatula*, se generaron plantas compuestas, que consisten en raíces transgénicas y una parte aérea no transformada, utilizando la metodología de transformación mediada por *A. rhizogenes* descrita previamente por Boisson- Dernier et al. (2001). Esta metodología ha sido empleada en nuestro laboratorio en estudios de la simbiosis en la raíz (Reynoso et al., 2013a; Hobecker et al., 2017) y también, en otros laboratorios en ensayos de la complementación de mutantes, tanto en nodulación como en micorrización (Boisson- Dernier et al., 2001; Ané et al., 2004; Gobbato et al., 2012). Las raíces fueron transformadas con las construcciones *p35S:FH*, *p35S:RBP47-FH* o *p35S:DCP1-FH* y seleccionadas en un medio Fahraeus- Agar (Fahraeus, 1957) al que se le adicionó el antibiótico kanamicina (Km^r), cuya resistencia se encuentra dentro del T-DNA transferido a la células de la raíz (Fig. 15). Luego de una semana, cuando ya se observa la emergencia de raíces transgénicas, se retira la selección para favorecer el desarrollo y crecimiento del sistema radical (Fig. 15 A). La eficiencia de transformación obtenida con las tres construcciones osciló entre 65 y 80%, un porcentaje similar al descrito por los autores que desarrollaron la técnica (Boisson-Dernier et al., 2001).

Figura 15. Obtención de plantas compuestas de *M. truncatula* que expresan las proteínas de fusión RBP47-FH y DCP1-FH en sus raíces. A. Se obtuvieron raíces transformadas con las construcciones *35S:FH* (control vector vacío), *35S:RBP47-FH* para la sobreexpresión de la proteína de SGs RBP47, y *35S:DCP1-FH*

para la sobreexpresión de la proteína de PBs, DCP1. La parte aérea de las plantas compuestas es *wt* y las raíces transgénicas. Las raíces transformadas fueron seleccionadas en medio Fahraeus (Fahraeus, 1957) que contiene el antibiótico kanamicina (*Km^r*), cuya resistencia está determinada por el gen *nptII* dentro del T-DNA transferido a las raíces. Una semana después se retira la selección para favorecer el desarrollo del sistema radical. Se presentan fotos de las plantas compuestas generadas con cada construcción. **B.** Análisis por *Western blot* de la expresión de las proteínas RBP47-FH y DCP1-FH en las raíces transformadas con las construcciones *35S:RBP47-FH* y *35S:DCP1-FH*, respectivamente. Se obtuvieron extractos proteicos totales de raíces transformadas con las construcciones *35S:FH*, *35S:RBP47-FH* o *35S:DCP1-FH* inoculadas con *S. meliloti* (Sm) como no inoculadas (M). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE 12 % (p/v), transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas en presencia del anticuerpo comercial anti-FLAG conjugado a la enzima *Horse Radish Peroxidase* (HRP). Los *immunoblots* fueron revelados por quimioluminiscencia y exposición a placa autorradiográfica (panel superior). A la derecha se indica el peso molecular de las proteínas de fusión RBP47-FH y DCP1-FH en Kilo Daltons (kDa). En paralelo, alícuotas de los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE (12%), y las proteínas se visualizaron por tinción con *Coomassie blue* (panel inferior).

Posteriormente se tomó el tejido de las raíces transformadas, se pulverizó y se verificó por *Western blot* la expresión de las proteínas utilizando anticuerpos anti-FLAG comerciales (**Fig. 15 B**). Para ambas construcciones se observaron bandas del tamaño teórico esperado para RBP47-FH y DCP1-FH (55 y 44 kDa, respectivamente) indicando la correcta expresión de las proteínas fusionadas al epítopo FLAG.

3. Análisis fenotípico de las plantas compuestas 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH

Para determinar si la expresión ectópica y constitutiva de las proteínas RBP47 o DCP1 provocaba cambios en el fenotipo en las raíces transformadas o en la parte aérea de las plantas de *M. truncatula*, se determinó la longitud de las raíces primarias, la longitud y densidad de las raíces secundarias y el número de nódulos a los 21 días post inoculación (dpi) con *S. meliloti* 1021, así como también la longitud de la parte aérea (**Fig. 16**).

Figura 16. Análisis fenotípico de plantas compuestas de *M. truncatula* transformadas con 35S:FH, 35S:RBP47-FH y 35S:DCP1-FH. Se evaluaron las raíces transformadas con las construcciones *p35S:FH* (control), *p35S:RBP47-FH* para la sobreexpresión de la proteína RBP47 componente de SGs, o *p35S:DCP1-FH* para la sobreexpresión de la proteína DCP1, componente de PBs. Los datos corresponden a plantas de 5 semanas luego de la transformación y a 21 dpi con *S. meliloti* 1021. Letras diferentes indican diferencias significativas según un test de comparación múltiple de Dunnett: 35S vs. RBP47; 35S vs. DCP1, $\alpha = 0.05$; *t* Test: RBP47 vs. DCP1: análisis de dos colas, $P < 0.05$. Se utilizaron entre 26 y 36 plantas, que generaron entre 87 y 165 raíces secundarias para cada construcción. **A.** Longitud de raíces primarias (cm). **B.** Longitud de raíces secundarias (cm). **C.** Densidad de raíces secundarias por cm de raíz primaria. **D.** Número de nódulos por raíz. **E.** Longitud de parte aérea (cm).

La transformación de las raíces de *M. truncatula* con las construcciones *35S:FH*, *35S:RBP47-FH* o *35S:DCP1-FH* no introdujo cambios en el fenotipo de las raíces. La

longitud de las raíces primarias y la densidad de las raíces secundarias no presentaron diferencias significativas respecto de las raíces transformadas con el vector vacío *35S:FH* (**Fig. 16 A y 16 C**). Sólo se observó un pequeño aumento en la longitud de las raíces secundarias de las plantas transformadas con *35S:RBP47-FH* y *35S:DCP1-FH* con respecto al control *35S:FH* (**Fig. 16 B**). Tampoco se observaron diferencias en la cantidad de nódulos formados a 21 dpi (**Fig. 16 D**), o en la longitud de la parte aérea (**Fig. 16 E**).

4. Evaluación de la inducción de genes de nodulación en las plantas compuestas *35S:RBP47-FH* o *35S:DCP1-FH*

El siguiente paso fue verificar que las plantas transformadas con las construcciones *35S:FH*, *35S:RBP47-FH* o *35S:DCP1-FH* respondieran efectivamente a la inoculación con *S. meliloti* y que se produjera la activación de genes marcadores de la organogénesis de nódulos y la infección rizobiana. Para ello, se determinaron mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) los niveles estacionarios de acumulación de los transcritos *ENOD11* (*Early Nodulation 11*) y *ENOD40* (*Early Nodulation 40*), a las 48 horas post inoculación (hpi) con agua (Mock) o con *S. meliloti* (Sm) (**Fig. 17**). *ENOD11* codifica una proteína de pared celular rica en prolinas que se induce tempranamente en las células epidérmicas de la raíz en respuesta a la infección rizobiana (Journet et al., 2001), mientras que *ENOD40* es un RNA altamente estructurado que es requerido para la activación de las divisiones celulares en el córtex dando lugar al primordio del nódulo (Crespi et al., 1994).

Figura 17. Análisis de los niveles de acumulación de nodulinas tempranas en raíces de *M. truncatula* transformadas con 35S:FH, 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH luego de la inoculación con *S. meliloti*. Se midieron los niveles relativos de los transcritos *ENOD11* y *ENOD40* a las 48 hpi con *S. meliloti* (Sm) o con agua (Mock, M) mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión se normalizaron por los niveles del gen de referencia *HIS3L*. Los valores de *ENOD11* se expresan en escala Log₁₀, mientras que los datos de *ENOD40* se expresan en escala lineal. Los (*) indican que existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles del mismo transcripto en los diferentes tratamientos comparados (t-test de dos colas, $p < 0,05$).

Se observó un incremento en los niveles de transcripto de *ENOD11* y *ENOD40* en todas las muestras inoculadas con respecto a las no inoculadas. Además, estos incrementos que varían desde 98 a 480 veces para *ENOD 11*, y de 1,15 a 2,73 veces en *ENOD40*, se encuentran en el orden del incremento descrito en trabajos anteriores para ambos genes en plantas *wt* o en plantas que expresan la proteína ribosomal RPL18 fusionada al epítipo HF (Tabla 2). Estos datos, sumados a que el crecimiento de las plantas transformadas no se vio afectado y el número de nódulos desarrollados fue similar al de las plantas *wt*, indican que la señalización y las respuestas moleculares activadas por el rizobio no estarían afectadas por las construcciones introducidas en las raíces de *M. truncatula*.

Tabla 2. Valores de expresión de genes de respuesta temprana a rizobios. Se midieron por RT- qPCR los niveles relativos de expresión de los genes *ENOD11* y *ENOD40* implicados en la respuesta temprana a rizobios en *M. truncatula*. Los datos corresponden a 48 hpi de las plantas con *S. meliloti* 1021, o no inoculadas, y normalizados con los niveles del transcripto del gen *Histona 3L*.

Gen	Identificador ^a	Tiempo de Inoculación (hpi) ^b	Niveles relativos a raíces no inoculadas			
			wild type (wt) ^c	35S:FLAG-RPL18 ^d	35S:RBP47-FH ^e	35S:DCP1-FH ^e
ENOD11	AJ297721.1	48	224,2	146,76 ± 20,08	98,25 ± 17,27	110,1 ± 35,97
ENOD40	X80264	48	2,4	2,3 ± 0,68	1,92 ± 0,06	1,74 ± 0,23

^a: Identificador de GenBank

^b hpi: horas post inoculación

^c: El valor de inducción del nivel de transcripto de *ENOD40* fue cuantificado a partir de ensayos de microarreglos en Lohar et al. (2006). El valor de *ENOD11* corresponde a datos de RT-qPCR reportados en Moreau et al., (2011)

^d: Los niveles de transcriptos se determinaron por RT-qPCR en plantas de *M. truncatula* transformadas para sobreexpresar la subunidad ribosomal RPL18, y que fueron tratadas con *S. meliloti* 1021 (Sm) o tratadas con agua (mock). Se presenta el cociente entre los valores de la condición Sm versus mock. Se indican los valores de la media ± desviación estándar de la media, normalizados con los niveles del transcripto del gen *Histona 3L* (Reynoso et al., 2013a).

^e: Los niveles de transcriptos se determinaron por RT-qPCR en plantas tratadas con *S. meliloti* 1021 y mock (tratadas con agua). En cada caso se presenta el cociente entre los valores de la condición Sm versus la condición mock. Se indican los valores de la media ± desviación estándar de la media de dos réplicas técnicas

5. Visualización de la dinámica de gránulos citoplasmáticos por microscopía confocal

Luego de verificar que la expresión de las proteínas RBP47-FH y DCP1-FH no generaba fenotipos visibles en las plantas de *M. truncatula*, y previo a poner a punto la técnica de RIP, nos planteamos evaluar la localización subcelular de dichas proteínas. A su vez nos propusimos evaluar si era posible visualizar los mRNPs que contiene dichas proteínas y si los mismos mostraban co-localización. Para ello, se realizaron dos ensayos de expresión de proteínas en planta. Por un lado, se transformaron raíces de *M. truncatula*, y por otro se transformaron hojas de *N. benthamiana*, ambos con construcciones que sobreexpresan las proteínas RBP47 o DCP1 fusionadas a una proteína fluorescente en su extremo Ct. Las dos construcciones, denominadas *35S:RBP47-rfp* y *35S:DCP1-yfp*, se generaron mediante recombinación sitio específica utilizando la tecnología Gateway, (**Fig. 18**). La construcción *35S:RBP47-rfp* (**Fig. 18 A**) permite la sobreexpresión de la proteína RBP47 fusionada a la proteína fluorescente roja (**RFP, Red Fluorescent Protein**) mientras que la construcción *35S:DCP1-yfp* dirige la sobreexpresión de la proteína DCP1 fusionada a la proteína fluorescente amarilla (**YFP, Yellow Fluorescent Protein**), (**Fig. 18 B**). Además, se utilizaron como controles las construcciones *35S:rfp* y *35S:yfp* que permiten la sobreexpresión de las proteínas RFP e YFP libres, respectivamente. En estas raíces se analizaron el número de mRNPs por célula, su forma y tamaño, y la posible interacción entre los diferentes complejos mRNPs *in vivo*.

Figura 18. Esquema de las construcciones 35S:RBP47-rfp (A) y 35S:DCP1-yfp (B). Esquema de las construcciones para la sobreexpresión de las proteínas RBP47 fusionada a RFP, y la proteína DCP1 fusionada a YFP. Para la generación de las construcciones se utilizaron plásmidos que portan un cassette GATEWAY (Fig. 14) descritos por Karimi et al., (2005). Los sitios *attL1* y *attL2* en el plásmido de clonado que flanquean el marco abierto de lectura de la proteína de interés se recombinan específicamente con los sitios *attR1* y *attR2* presentes en el plásmido de expresión. El plásmido de destino contiene el gen que confiere resistencia a Cloramfenicol (*CmR*) y el gen *ccdB* para selección de bacterias dentro de los sitios de recombinação, y además posee el gen que confiere resistencia a Streptomicina/ Spectinomicina (*Sm/Sp^r*) para la selección de las plantas transformadas.

En una primera instancia, nos propusimos evaluar la localización subcelular de cada una de las proteínas de los mRNPs, tanto en raíces transformadas de *M. truncatula*, como en hojas de *N. benthamiana* utilizando microscopía confocal de fluorescencia. Si bien se intentó la transformación de ambas plantas con las dos construcciones, no pudimos observar gránulos con RBP47-RFP en raíces de *M. truncatula* o gránulos con DCP1-YFP en hojas de *N. benthamiana*. Sin embargo, tuvimos éxito en la co-transformación de *N. benthamiana* con ambas construcciones, lo que permitió evaluar la interacción de estos mRNPs *in vivo* en tejido foliar.

Se ha descrito que la proteína RBP47 puede encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma, formando parte de los SGs (Weber et al., 2008). En la **Figura 19 A-1, 19 A-2** puede observarse la fluorescencia roja emitida por la proteína de fusión RBP47-RFP tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células de hojas de *N. benthamiana*. Por

su parte, DCP1 es una proteína citoplasmática que se encuentra en PBs formando el complejo de *decapping* (Xu et al., 2006). En el panel **A-3** de la **Fig. 19** puede observarse la localización de DCP1-YFP en el citoplasma de células de raíz de *M. truncatula*, formando entre 5 y 8 gránulos por célula de un tamaño aproximado de 0,5 μm , en concordancia con lo descrito anteriormente en células de mamíferos (Hubstenberger et al., 2017).

Figura 19. Posicionamiento y dinámica de gránulos citoplasmáticos. Imágenes de microscopía confocal sobre muestras de raíces de *M. truncatula* u hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones 35S:RBP47-rfp que sobreexpresa la proteína RBP47 (marcadora de SGs) unida a la proteína RFP en su extremo Ct, o con la construcción 35:DCP1-yfp que sobreexpresa la proteína DCP1 (marcadora de PBs) unida a la proteína YFP en su extremo Ct. **A.** La columna izquierda (YFP) muestra el canal para la

observación de la proteína YFP; la columna a continuación (RFP) muestra el canal para la observación de la proteína RFP; la columna siguiente (Transmisión) muestra lo observado con luz blanca; la columna final a la derecha (Merge) muestra la combinación de los tres canales anteriores. **A-1.** Hojas de *N. benthamiana* transformadas con *35S:RBP47-rfp* donde se muestra su distribución en citoplasma y núcleo. Escala: 75 μm . **A-2.** Detalle de la presencia de *35S:RBP47-rfp* en el núcleo de las células y en citoplasma. Escala: 5 μm . **A-3.** Raíces de *M. truncatula* que sobreexpresan *35S:DCP1-yfp*. Su distribución se observa concentrada en puntos de aproximadamente 0,5 μm en el citoplasma, observándose entre 5 y 8 gránulos por célula. Escala: 10 μm . **B.** Ensayo de co-inoculación de hojas de *N. benthamiana* con *35S:RBP47-rfp* y *35S:DCP1-yfp*. Puede observarse el movimiento coordinado de un gránulo de PB junto a uno de SG, posiblemente por una interacción directa entre ellos (*docking*), posiblemente para el intercambio de mRNPs (Weber et al., 2008). Las flechas blancas muestran la posición de cada orgánulo al tiempo cero (Fila superior). Las filas siguientes muestran el movimiento de los orgánulos en lapsos de 7 seg entre cada fotografía. Escala: 2 μm .

Anteriormente se había descripto tanto en levaduras como en mamíferos que los PBs y los SGs pueden interactuar físicamente entre sí (*docking*), y que en ese contacto podrían intercambiar mRNAs y/o proteínas que pueden participar en la estructura de ambos gránulos (Kedersha et al., 2005b). Por esta razón se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo de las construcciones *35S:RBP47-rfp* y *35S:DCP1-yfp* en hojas de *N. benthamiana* que fueron transformadas con ambas construcciones (**Fig. 19 B**). Pudimos observar que ambas marcas se encuentran asociadas y que se mueven juntas durante un período de aproximadamente 15- 20 seg (Ver video en el Material Suplementario). Este resultado sugiere que en tejido vegetal también se observa el *docking* entre PBs y SGs. También pudimos observar en estas muestras algunos gránulos con DCP1 moviéndose solos, aunque no pudimos obtener evidencia de gránulos con RBP47 solos en muestras co- transformadas.

6. Inmunopurificación de gránulos citoplasmáticos

Una vez confirmado que las plantas de *M. truncatula* compuestas expresan las proteínas de fusión *35S:RBP47-FH* o *35S:DCP1-FH*, que las mismas poseen la localización subcelular descripta previamente en otras especies y que no se generan efectos visibles sobre el fenotipo, se procedió a ensayar la técnica de inmunopurificación de complejos RNPs (*RIP*). El procedimiento utilizado fue el descripto por Sorenson y Bailey-Serres (Alonso and Stepanova, 2015), el cual se esquematiza en la **Figura 20**.

Figura 20. Enrichimiento de RNPs por Inmuno Purificación (RIP) en *M. truncatula*. La purificación se realizó a partir de raíces que sobreexpresan RBP47 o DCP1 fusionadas al epítopo FLAG-His. Las raíces fueron pulverizadas en N_2 líquido y homogeneizadas en un *buffer* de extracción de RNPs (*Buffer RNP*), que contiene inhibidores de proteasas, detergentes y DTT como agente reductor (parte inferior del esquema). El extracto celular total fue centrifugado y filtrado utilizando *Miracloth*. Se extrajo una alícuota de este extracto al cual se lo denominó “*Total*”, para llevar adelante la extracción de RNA total y para la detección de la proteína de fusión por *Western blot*. El resto del extracto se incubó durante 2 horas con anticuerpo antiFLAG (α -FLAG) unido a bolillas magnéticas (parte superior del esquema) para permitir la unión de la proteínas de fusión (35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH) a los anticuerpos antiFLAG. Se colectaron las bolillas con el complejo antiFLAG-proteína-RNA en el borde del tubo utilizando un separador magnético (parte central), y se tomó una alícuota que denominamos “*Unbound*”, que representa a las proteínas que no se unieron al anticuerpo. Luego de 4 lavados se tomó una alícuota denominada “*RIP*”, y se guardó el resto de las bolillas en freezer a $-80^\circ C$ para su posterior utilización, ya sea extracción de RNA, preparación de bibliotecas para secuenciación masiva, o para un análisis por *Western blot*.

Brevemente, se colectó el tejido de raíces de *M. truncatula* transformadas con 35S:FH, 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH y se pulverizó en mortero bajo N_2 líquido hasta obtener un polvo muy fino. A partir de este tejido se comenzó la extracción de los complejos mRNPs que contienen la proteína 35S:RBP47-FH o 35S:DCP1-FH utilizando para a homogenización de tejido el *buffer* de extracción denominado *RNP extraction buffer* (*Buffer RNP*). Este *buffer* tiene pH alcalino para evitar que las vacuolas ácidas o lisosomas acidifiquen el pH del extracto, generando las condiciones óptimas para la acción de RNAsas. A su vez, el *buffer RNP* contiene una alta fuerza iónica (para prevenir la degradación de RNPs y disminuir la susceptibilidad a las RNAsas exógenas), inhibidores de proteasas, y detergentes (para permitir la liberación de proteínas de membranas y citoesqueleto). Luego de la homogenización inicial de los extractos, se

realizó una centrifugación y filtración para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido, que es considerado el extracto total o *Input*, se incubó con el anticuerpo antiFLAG conjugado a bolillas magnéticas para permitir la unión de los complejos mRNPs asociados a 35S:RBP47-FH o a 35S:DCP1-FH. Después de incubación durante dos horas con agitación en frío, se separaron las bolillas asociadas a los complejos mRNPs. Se tomó una alícuota del sobrenadante, la cual denominamos “*Unbound*” (*Unb*). Se realizaron cuatro lavados con *buffer* de lavado, y luego se tomó una alícuota de las bolillas que denominamos “*RIP*” para análisis mediante *Western blot*. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el método utilizado permitió inmunopurificar la proteína RBP47-FH expresada en raíces de *M. truncatula*, (**Fig. 21 A**). No pudimos visualizar la presencia de DCP1 por *Western blot* en muestras RIP. Posiblemente la baja concentración de esta proteína desde la muestra *Input* sea una limitante, además se debe tener en cuenta que en cada paso del procedimiento no se recupera la totalidad de las proteínas (ver discusión). El resto de las bolillas magnéticas se almacenaron en freezer a -80° C para su posterior utilización para la extracción de RNA.

Figura 21. Inmunopurificación de proteínas componentes de SGs y PBs en *M. truncatula*. **A.** Durante el proceso de inmunopurificación de mRNPs se tomaron tres muestras para analizar por *Western blot* la eficacia del método para aislar la proteína 35S:RBP47-FH, utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítopo FLAG (α -FLAG), además del vector vacío 35S:FH como control. Se muestran las fracciones Total (*Input*), no unido (*Unb*) e inmunoprecipitado (*RIP*) tomadas de muestras de raíces de *M. truncatula* transformadas con el vector 35S:RBP47-FH. Las muestras corresponden a aproximadamente el 1 % para *Input* y *Unbound*, y un 10 % para *RIP* del volumen extraído en cada paso. La migración del marcador de

peso molecular se indica a la izquierda. **B.** PCR semicuantitativa a 25 ciclos sobre muestras Totales o RIP obtenidas desde tejido de raíces de *M. truncatula* inoculadas (Sm), o no inoculadas (Mock). Se utilizaron los *primers* para *Histona 3L* (Medtr4g097170). Los resultados de la PCR se muestran en gel de agarosa al 1%. **C.** PCR a 35 ciclos sobre muestras Totales o RIP obtenidas desde tejido de raíces de *M. truncatula* inoculadas (Sm), o no inoculadas (Mock). Se utilizaron los *primers* para *Actina 11* (Medtr2g008050).

Para confirmar la presencia de mRNA asociado a las proteínas RBP47-FH y DCP1-FH inmunoprecipitadas, se realizó la extracción de RNA a partir de las muestras RIP. En paralelo también se realizó una extracción de RNA total, el cual se purificó a partir de una alícuota del *Input*. Se determinaron los rendimientos de RNA obtenidos a partir de las muestras de RNA total y RNA RIP, los cuales se presentan en la **Tabla 3**. El rendimiento de RNA promedio fue de 89 y 87 ng/ml de tejido para las muestras de RNA Total y para las muestras de RNA RIP, respectivamente. Luego, para confirmar la presencia de mRNA se realizó una síntesis de DNA complementario (cDNA) (secciones **9.1** y **9.2** de Materiales y Métodos) seguida de una PCR semicuantitativa utilizando *primers* para el gen de *Histona 3L* (*HIS3L*, Medtr4g097170). Se detectó la presencia de mRNAs *HIS3L* en casi todas las muestras, excepto en las muestras RIP de raíces transformadas con la construcción 35S-HF o que expresan DCP1-FH, tanto inoculadas, como no inoculadas (**Fig. 21 B**). En concordancia con este resultado, se ha descripto que los PBs carecen de copias de mRNA de los genes de histona (Hubstenberger et al., 2017). Por esta razón se realizó una reacción de PCR utilizando *primers* correspondientes al gen de *Actina11* (*ACT11*, Medtr2g008050). Se detectó la presencia de copias del mRNA del gen en todas las muestras (**Fig. 21 C**). Este resultado nos permite confirmar la presencia de mRNA en muestras inmunoprecipitadas por RIP, tanto en muestras de SGs, como de PBs. Además, en función de estos resultados, seleccionamos *ACT11* como gen de referencia para los ensayos cuantitativos de mRNA.

Tabla 3. Cantidad de RNA obtenido por RIP de SGs y PBs.

Muestra	Concentración (ng / μ l)	RNA Total (ng)	Rendimiento (ng RNA/ ml tejido)
RBP47-M-Total	18,1	543	72,4
RBP47-M-RIP	44,7	1341	178,8
RBP47-Sm-Total	31,2	936	124,8
RBP47-Sm-RIP	14,3	429	57,2
DCP1-M-Total	19	570	76
DCP1-M-RIP	12,6	378	50,4
DCP1-Sm-Total	20,8	624	83,2
DCP1-Sm-RIP	16,1	483	64,4

7. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la nodulación sobre muestras RIP de las construcciones 35S:RBP47-FH y 35S:DCP1-FH

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que, aunque la traducción no está afectada globalmente, los mRNAs que codifican proteínas con funciones en la vía de señalización del NF se reclutan selectivamente en polisomas en etapas tempranas de la interacción (Reynoso et al., 2013a), (**Fig. 12**). Una hipótesis planteada frente a este comportamiento es que, tanto los PBs como los SGs podrían tener implicancia directa en la regulación postranscripcional de la vía de señalización del NF, a través del intercambio de mRNAs específicos de la vía con la maquinaria traduccional, requeridos en etapas tempranas de la interacción. Para corroborar esta hipótesis se midió la abundancia relativa de los mRNAs de genes involucrados en la vía del NF que mostraron previamente una regulación traduccional en respuesta a *S. meliloti* (**Fig. 6**, Reynoso et al, 2013a). La lista de genes incluye *DMI1* (Medtr2g005870.1), *DMI2* (Medtr5g030920.1), *NSP1* (Medtr8g020840.1), *NSP2* (Medtr3g072710.1) y *NF-YA1* (Medtr1g056530.1). La selección de estos genes responde a su regulación postraduccional y unión diferencial a polisomas cuando *M. truncatula* es inoculada con *S. meliloti*. *DMI1* fue el único gen analizado que mostró una regulación heterodireccional negativa en la infección bacteriana (aumento a nivel del RNA total, pero disminución en su asociación con polisomas), mientras que *DMI2*, los factores de transcripción *NSP1* y *NSP2*, y la subunidad *NF-YA1* del complejo transcripcional NF-Y, presentan una regulación positiva significativa a nivel de traducción en presencia de rizobios. Los niveles de transcritos de estos genes se determinaron en muestras de RNA total o en muestras RIP de SGs y

PBs a las 48 hpi con *S. meliloti* o con agua (Mock). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 22**.

Figura 22. Análisis de la abundancia relativa de mRNAs de genes involucrados en la vía del NF, sobre muestras RIP de SGs y PBs. Los niveles de los mRNAs de los genes seleccionados fueron analizados por RT-qPCR en muestras de RNA Total (columna 1), o muestras purificadas por RIP de SGs (columna 2) y PBs (columna 3). Se utilizó el tejido de raíces de *M. truncatula* que sobreexpresan la proteína de SGs, RBP47 (35S:RBP47-FH), o la proteína de PBs, DCP1 (35S:DCP1-FH). Los valores de las muestras control (barras grises, Mock), y las muestras inoculadas con *S. meliloti* (barras negras, Sm) fueron normalizados por el nivel del transcritto del gen de *Actina 11* (Medtr2g008050) y se muestran relativos a los valores de las muestras Mock de cada muestra a la cual se le otorgó un valor de 1. Los datos corresponden a la media $\pm$ la desviación estándar de la media de dos réplicas técnicas normalizadas. Los asteriscos (*) indican que los valores de muestras inoculadas con *S. meliloti* son significativamente diferentes estadísticamente de las muestras control en un *t*-test no apareado de dos colas, con $P < 0,05$.

Todos los transcritos de la vía del NF seleccionados en este trabajo aumentaron su abundancia a nivel de RNA total en respuesta al rizobio (**Fig. 22**). Esto puede verse como

un aumento en las muestras Sm (barras negras) en los gráficos de RNA Total (Columna 1), con respecto al control *mock* (barras grises). Esta tendencia también fue observada en muestras totales de trabajos previos (Reynoso et al., 2013a).

DMI1, que fue el único gen de la vía del NF que presentó una regulación negativa en su asociación a polisomas (aumento de los niveles totales de transcripto, pero una disminución de su asociación a polisomas). En muestras RIP inoculadas, este gen presentó una mayor asociación tanto a SGs como a PBs en muestras inoculadas con *S. meliloti* respecto de las muestras *mock* (9x y 2,6x, respectivamente). Los transcriptos correspondientes a *NSP2* presentaron un aumento en su asociación a SGs de aproximadamente 3 veces y una disminución de su asociación a PBs de aproximadamente 4 veces en las muestras inoculadas con el rizobio respecto a las muestras *mock*. Por otra parte, tanto *DMI2* como *NSP1* presentaron una disminución de más de dos veces en su asociación a SGs, y un aumento de su asociación a PBs cuatro y más de 20 veces, respectivamente, en respuesta a la inoculación. En contraposición, los mRNAs de *NF-YA1* mostraron una disminución muy importante (0,04x) en su asociación a SGs y una leve disminución (0,5x) en PBs.

Para una evaluación cuantitativa de la dinámica de cada mRNA en los diferentes gránulos, y para independizarse de los cambios a nivel estacionario de los mRNA, se calculó el cociente de la relación entre la variación a nivel de mRNA asociado a SGs o PBs y la variación a nivel de mRNA total para cada transcripto en respuesta a la inoculación con rizobio según las siguientes fórmulas: $\text{Valor (SG Sm/ SG mock) / Valor (Total Sm/Total mock)}$ y $\text{Valor (PB Sm/PB mock) / Valor (Total Sm/Total mock)}$ para SGs y PBs, respectivamente. Estos datos fueron comparados con los datos del cociente de la variación en la asociación a polisomas de cada mRNA sobre la variación en el RNA Total, obtenidos en trabajos previos por la técnica de TRAP (Reynoso et al, 2013a), (**Tabla 4**). Los valores mayores a 1 implican una regulación positiva de la asociación de los mRNA a cada uno de los complejos RNP en respuesta al rizobio. Es decir, que hay un aumento de la asociación a estos complejos celulares mayor al cambio de la abundancia en las muestras de RNA total en respuesta a la inoculación. Por el contrario, valores menores a 1 implican una regulación negativa de la asociación del transcripto a estos complejos celulares.

Tabla 4. Variación de la asociación de mRNAs de la vía del NF a polisomas, SGs y PBs, en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*.

	TRAP ^{ab} Polisomas	RIP ^b SGs	RIP ^b PBs
DMI1	0,4 x	3,46 x	4,38 x
DMI2	3,0 x	0,16 x	4,68 x
NSP1	3,8 x	0,003 x	2,79 x
NSP2	4,0 x	0,72 x	6,25 x
NF-YA1	2,9 x	1,11 x	0,11 x

^a: Muestras obtenidas por la técnica TRAP (Reynoso et al, 2013a)

^b: Cociente entre la variación de la abundancia de mRNA unidos a polisomas, SGs o PBs, sobre la variación de la abundancia de mRNA totales en cada muestra.

Como se mencionó anteriormente, *DMI1* fue el único gen de la vía del NF que mostró una regulación negativa a nivel de la traducción (0,4x). En línea con este resultado, presentó un aumento en su asociación, tanto a SGs (3,46x), como a PBs (4,38x) en presencia de rizobio. A partir de estos datos, podríamos inferir que parte de los transcriptos que disocian de la maquinaria traduccional en respuesta al rizobio, serían movilizados a SGs y PBs, con la posibilidad de reiniciar su traducción en etapas posteriores de la interacción.

NSP2 presenta un aumento en los niveles estacionarios de mRNA en las muestras de RNA total y un aumento mayor de su fracción asociada a la maquinaria traduccional (4,0x veces). También se observó un aumento en su asociación a PBs (6,25x), pero una disminución en su asociación a SGs (0,72x) en respuesta al rizobio. Este resultado implicaría que parte del aumento en los niveles de mRNA de *NSP2* en polisomas y/o en PBs, sería gracias a una liberación parcial de estos mRNAs (28%), que estarían almacenados en SGs previo a la inoculación con el rizobio.

NSP1, *DMI2* y *NF-YA1* mostraron un aumento de los transcriptos asociados a la maquinaria traduccional (3,8x, 3,0x y 2,9x, respectivamente). Al igual que *NSP2*, transcriptos de los genes *DMI2* y *NSP1* presentaron una disminución en su asociación a SGs (0,16x, 0,003x, respectivamente), y un aumento en su asociación a PBs (4,68x y 2,79x, respectivamente). Contrariamente, *NF-YA1* presentó una disminución en su asociación a PBs (0,11x), pero su asociación a SGs no mostró cambios significativos frente a la inoculación (1,1x). La separación de los mRNA de *DMI2* y *NSP1* de los SGs es

muy pronunciada, mientras que en el caso de *NSP2* la disminución de esta asociación es menos drástica. En el caso de *NF-YA1*, el aumento de los mRNAs que se movilizan a polisomas se correlaciona con la disminución de la asociación a PBs.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

En este primer capítulo de la presente tesis doctoral, se trabajó en la puesta a punto de la técnica de purificación de complejos RNPs que contienen las proteínas DCP1 y RBP47. Teniendo en cuenta que estudios previos mostraron que estas proteínas han sido fuertemente asociadas a la formación de PBs y SGs, consideramos que los RNAs asociados que obtuvimos a partir de la inmunoprecipitación de estas proteínas, representan la subpoblación de RNAs citoplasmáticos asociados a dichos complejos RNP. Sin embargo, y teniendo en cuenta que el ensamblado/ desensamblado de SGs y PBs es un proceso altamente dinámico, no es posible excluir la posibilidad de que algunos de los RNAs se encuentren asociados a las proteínas RBP47 y DCP1 por fuera de dichos RNPs, incluso si consideramos que RBP47 también acompaña mRNAs dentro del núcleo. Si bien la sobreexpresión de estas proteínas podría haber afectado la normal formación de los complejos SGs y PBs, las imágenes obtenidas en este capítulo por microscopía confocal de localización subcelular de las proteínas de fusión RBP47-RFP y DCP1-YFP, no mostraron un cambio en la forma, número o dinámica de estos elementos respecto a lo reportado en bibliografía (Weber et al., 2008; Hubstenberger et al., 2017; Xu et al., 2006). Se ha descrito que los mRNAs que codifican para las proteínas constituyentes de PBs se encuentran concentrados en PBs, posiblemente como parte de un sistema de autorregulación del número de estos orgánulos por célula (Hubstenberger et al., 2017). De hecho, en humanos la acumulación excesiva de agregados de RNPs citoplasmáticos están asociados a enfermedades neurodegenerativas (Alberti and Hyman, 2016). En línea con esto, se ha descrito en *Arabidopsis* que la localización en gránulos de DCP1 y su abundancia no varían frente a estrés por calor, y que la subunidad catalítica del complejo de *decapping*, la proteína DCP2, se relocaliza junto a DCP1 en PBs sólo en condiciones de estrés térmico (Iwasaki et al., 2007; Motomura et al., 2015).

Dada la importancia de la degradación de mRNAs a través del *decapping* en PBs en las transiciones del desarrollo o la reprogramación génica (Chantarachot and Bailey-Serres, 2017), trabajos donde han sobreexpresado DCP1 en *A. thaliana*, se observó un fenotipo anormal en el crecimiento reproductivo de las plantas (Iwasaki et al., 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de las proteínas RBP47 o DCP1 en las raíces de *M. truncatula* no generó alteraciones fenotípicas en la morfología de las plantas (**Fig. 16**). Sólo se

detectó un pequeño aumento de la longitud de las raíces secundarias en las construcciones *35S:RBP47-FH* y *35S:DCP1-FH* con respecto al control *35S:FH* (**Fig. 16 B**), manteniendo sin cambios la longitud de las raíces primarias, la densidad de las raíces secundarias y el número de nódulos (**Fig. 16 A, C, D**). Tampoco se vio alterada la capacidad de las plantas de censar y responder a la presencia de los rizobios y activar los programas genéticos de formación del hilo de infección y la organogénesis del nódulo (**Fig. 16 C; Fig. 17**), por lo que la técnica desarrollada permite estudiar la dinámica de los RNAs citoplasmáticos en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

La inspección por microscopia confocal de las fusiones de RBP47 y DCP1 a proteínas fluorescentes también permitió observar la dinámica de los mRNPs *in vivo* en tejido foliar de *N. benthamiana*. Pudimos confirmar que existe *docking* entre los SGs y PBs, al menos en tejido epidérmico de *N. benthamiana*, semejante a lo descrito previamente en protoplastos de mesófilo en *A. thaliana* (Weber et al., 2008) y en células de levaduras (Kedersha et al., 2005b), (**Fig. 19**).

Al presente, sólo se han descrito en plantas datos de microarreglos de muestras de SGs en *A. thaliana* en condiciones de hipoxia (Sorenson and Bailey- Serres, 2014). La población global de RNAs asociados a SGs y PBs ha sido caracterizada en humanos y, en el caso de SGs, también en levaduras (Khong et al., 2017; Hubstenberger et al., 2017). La constitución de los mRNA y proteínas que componen los SGs y PBs es muy diversa y depende de múltiples variables, desde el organismo en estudio, del estado celular, hasta incluso el tipo celular específico y su estadio de desarrollo (Standart and Weil, 2018). Es por esto, que la extrapolación de resultados o la inferencia de comportamientos de los mRNPs por comparación, podría derivar en falsas especulaciones sobre el rol de estos orgánulos en cada sistema de estudio. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica en una planta leguminosa para caracterizar el movimiento de RNAs entre los diferentes complejos RNP citoplasmáticos que regulan la expresión génica durante la simbiosis en las raíces de *M. truncatula*. En una etapa posterior se construirán bibliotecas para secuenciación masiva utilizando la tecnología de *Illumina*, tal como ya se ha hecho con las muestras provenientes de TRAP (Traubenik et al, 2019). El RNA purificado durante el desarrollo de esta tesis posee la calidad y concentración necesarias para llevar a cabo estos experimentos.

Gracias al desarrollo de la técnica RIP para el modelo biológico de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*, hemos podido obtener un rendimiento de aproximadamente 50-200 ng de mRNA por ml de tejido, tanto para las muestras RIP de SGs o de PBs (**Tabla 3**). En comparación, la eficiencia de TRAP fue de 400- 500 ng de mRNA por ml de tejido pulverizado (Reynoso et al., 2013a). Esta diferencia puede reflejar la cantidad de RNA asociado a cada complejo RNP, relacionados también con la concentración y función de cada proteína utilizada de cada orgánulo, así como a aspectos metodológicos que pueden ser optimizados. Por esto también, creemos que sólo pudimos confirmar por *Western blot* la purificación y concentración de RBP47 por el método RIP (**Fig. 21 A**). Por lo ya mencionado anteriormente, con respecto a la importancia del complejo *decapping* en la regulación postranscripcional, y la autorregulación de PBs sobre sus propios componentes, posiblemente la abundancia de DCP1 sea baja y dificulte la detección de dicha proteína mediante *Western blot*. Sin embargo, la detección del mRNA *ACT11* y de otros RNAs de la vía de señalización del NF a partir de muestras RIP de DCP1 (**Fig. 21 C y Fig. 22**), confirmarían que el RNA extraído corresponde efectivamente a muestras de PBs.

El análisis de los datos de abundancia de mRNAs de genes involucrados en la vía de señalización del NF, permitió confirmar que todos los genes analizados aumentan sus niveles basales de transcripción frente a la inoculación con *S. meliloti* (**Fig. 22**, columna 1). Un estudio previo de nuestro laboratorio mostró que los transcriptos *DMI2*, *NSP1*, *NSP2* y *NF-YA1* aumentan su asociación a polisomas, mientras que *DMI1* la disminuye en respuesta a la inoculación con rizobios (Reynoso et al., 2013a). Estos resultados sugieren que existe una removilización de mRNAs entre diferentes orgánulos RNP en el citoplasma que contribuye a regular la expresión de los genes que participan en la respuesta a la simbiosis y que regulan la infección y la organogénesis del nódulo. Por esto, se estudió la dinámica de estos genes en PBs y SGs.

Los niveles estacionarios de mRNA del gen *DMI1* en SGs y en PBs aumenta cuando las plantas son inoculadas (**Tabla 4, Fig. 22**). Esto podría explicar el destino de los transcriptos de *DMI1* que se disocian de los polisomas luego de la inoculación con rizobios. Los mismos podrían ser secuestrados en SGs y PBs para una respuesta inmediata a cambios en el ambiente, recordando que *DMI1* forma un canal catiónico

presente en la membrana nuclear que regula el *calcium spiking*, clave para la transducción de la señal del NF (Ané et al., 2004), y otras cascadas de señales donde la concentración de calcio citoplasmático es esencial.

Con respecto a la abundancia de mRNAs en SGs y PBs de los genes *DMI2*, *NSP1* y *NSP2*, se observó un aumento en su asociación a PBs, pero una disminución en SGs (**Tabla 4**). Mientras que para el gen *NF-YA1*, se observó el efecto contrario. El resultado final es el mismo para los 4 genes analizados, hay un incremento de sus transcriptos unidos a polisomas. Sin embargo, el origen de estos mRNA es diferente para el caso de *NF-YA1*, con respecto a *DMI2*, *NSP1*, y *NSP2*. *NSP1* y *NSP2* son factores de transcripción que forman un heterodímero, y en conjunto con *ERN1* promueven la activación transcripcional de la nodulina *ENOD11* (**Fig. 6**). En polisomas, se observó una fuerte correlación del aumento de la asociación de ambos transcriptos en respuesta al rizobio, por lo que se esperaba una correlación similar, tanto en SGs como en PBs. Sin embargo, su regulación postranscripcional parece ser opuesta: mientras que los mRNA de *NSP1* se desprenden de SGs y se acumulan en PBs, los mRNA de *NSP2* se concentran en SGs y se liberan de PBs, durante la simbiosis (**Fig. 22**). Esto lleva a especular que el secuestro y regulación postranscripcional de estos transcriptos es por vías diferentes, aunque su regulación traduccional es similar.

Por su parte, a diferencia de los otros genes analizados, el movimiento de *NF-YA1* hacia polisomas proviene de PBs. Se ha descrito que la expresión de este gen es regulada negativamente a nivel postranscripcional por la acción del microRNA miR169 durante la formación del nódulo en *M. truncatula* (Combier et al., 2006). La vía de acción principal de los miRNA en plantas consiste en el clivaje endonucleolítico de los mRNA *target* vía la proteína AGO1 dirigida por el miRNA. Este clivaje genera dos productos que son degradados desde sus extremos en sentido 5'-3' y 3'-5' por acción de XRN4 y el complejo citoplasmático exosoma, respectivamente (Souret et al., 2004; Yu et al., 2016). Sin embargo, este no es el único modo de acción de los miRNA, sino que también participan en la inhibición de la traducción de sus mRNA diana (Li et al., 2013). Los PBs han sido descritos como los orgánulos principales donde se concentra mayormente la maquinaria de silenciamiento por miRNA (Liu et al., 2005; Brodersen et al., 2008), por lo que podemos inferir que los mRNA de *NF-YA1* estarían asociados a PBs por acción del miR169, pero no estarían allí para su degradación, sino concentrados para su

almacenaje. La infección por *S. meliloti* induciría la liberación de los transcritos de *NF-YA1* desde PBs para asociarse a polisomas y reanudar su traducción.

Esta liberación diferencial de transcritos desde los diferentes orgánulos hacia polisomas, SGs o PBs, sugiere una regulación postranscripcional específica para cada gen de la vía del NF. Por ejemplo, en la regulación y secuestro de mRNAs de *NF-YA1* se encuentran implicados principalmente los PBs, en contraposición a lo observado para *DMI2*, *NSP1* y *NSP2*, donde los complejos RNP citoplasmáticos implicados en su regulación son principalmente los SGs. Pero al mismo tiempo, se desprende la idea de una regulación integral de todos los genes implicados en la vía del NF, que contempla a los mRNAs concentrados tanto en SGs como en PBs, y liberados en conjunto frente al estímulo de la inoculación. Este tipo de regulación postranscripcional conjunta de genes involucrados en una misma vía se denomina *regulón*, y fue descrita inicialmente en células epiteliales humanas, teniendo como único orgánulo regulador a los PBs (Hubstenberger et al., 2017; Standart and Weil, 2018).

Finalmente, el análisis de los datos presentados en este capítulo indican que existe una regulación postranscripcional de la vía del NF en *M. truncatula* que depende de la acción conjunta de los polisomas, los SGs y los PBs, como un sistema de ajuste fino de la regulación génica en citoplasma (**Fig. 23**).

Figura 23. Esquema propuesto de la regulación postranscripcional en citoplasma de algunos genes involucrados en la vía del NF en la simbiosis entre *M. truncatula*- *S. meliloti*. En la regulación génica postranscripcional en citoplasma de algunos genes involucrados en la vía del NF como *DMI1*, *DMI2*, *NSP1*, *NSP2* y *NF-YA1*, estarían involucrados los polisomas, los SGs y los PBs. En ausencia de rizobios, los SGs se comportarían como orgánulos de almacenamiento de mRNA de los genes *DMI2*, *NSP1* y *NSP2* (**B**). Mientras que en PBs se almacenarían copias de mRNA del gen *NF-YA1* (**D**). En presencia de rizobios, estos mRNAs se movilizan hacia polisomas para reanudar su traducción activamente (**B'**, **D'**). Además, se observa un aumento de la abundancia de mRNA de *DMI2*, *NSP1* y *NSP2* en PBs (**C**). *DMI1*, presenta una disminución de su asociación a polisomas en respuesta a rizobios y un aumento de su abundancia en SGs y en PBs. Posiblemente por una movilización desde polisomas en dirección a estos orgánulos (**A** y **A'**). Aquellos mRNA que fueron movilizados a polisomas, pueden volver a ser traducidos activamente por la maquinaria traduccional (**E**).

Capítulo II

*Análisis de las características de los
mRNAs de M. truncatula que
cambian su eficiencia traduccional
frente a la inoculación con S.
meliloti*

Resultados y Discusión

En este capítulo abordaremos el tercer objetivo específico propuesto en la presente Tesis Doctoral, el cual apunta a establecer una correlación entre los genes de *M. truncatula* que son regulados a nivel de la traducción en respuesta a *S. meliloti*, con aspectos estructurales de los mRNAs tales como la longitud y estructura de las regiones codificante (CDS), 5'- y 3'- UTR, y secuencias consenso dentro de estas regiones.

1. El control traduccional y su papel en la regulación de la expresión génica en el contexto de la nodulación

En el contexto de la nodulación, la formación de nódulos funcionales requiere la activación de la infección rizobiana en la epidermis de la raíz y la organogénesis del nódulo, que ocurre en las capas de células corticales debajo del sitio de infección (**Fig. 6**), dos programas genéticos independientes, pero estrechamente coordinados. La reprogramación transcripcional se ha caracterizado en diferentes etapas de la simbiosis de *M. truncatula*- *S. meliloti* en órganos completos (El Yahyaoui et al., 2004; Lohar et al., 2006; Benedito et al., 2008; Maunoury et al., 2010; Moreau et al., 2011), capas específicas de células de raíz (Breakspear et al., 2014; Jardinaud et al., 2016) y nódulos (Limpens et al., 2013; Roux et al., 2014). Sin embargo, poco se sabe sobre cómo el control de la traducción y la estabilidad de los mRNA contribuyen a la reprogramación de las células de la raíz para la simbiosis.

Como describimos anteriormente, en nuestro laboratorio se ha mostrado que muchos genes de *M. truncatula* regulados en respuesta *S. meliloti* no presentan una correlación directa y lineal entre los cambios en sus niveles de transcripción y sus niveles de traducción (Reynoso et al., 2013a, Traubenik et al, 2019). A partir de datos de RNA-Seq del transcriptoma y el traductoma de *M. truncatula* por el método de TRAP, se ha podido estimar la **Eficiencia Traduccional (ET)** de cada mRNA. La ET es calculada como la proporción de lecturas por kilopares de bases por millón de lecturas (**FPKM**) de los mRNA en las muestras de RNA de TRAP sobre las FPKM en las de RNA total. Este parámetro se considera una estimación confiable de la eficiencia de la utilización de mRNA para la síntesis de proteínas y un parámetro crítico para evaluar la contribución

de la traducción como otro nivel en la regulación de la expresión génica (Ingolia et al., 2009; Dunn et al., 2013). Luego se calculó el cambio en la ET comparando las muestras inoculadas con *S. meliloti* versus las inoculadas con agua (mock). El cambio en la ET varió más de 250 veces como consecuencia de la inoculación. El análisis estadístico de los datos permitió identificar 532 genes (2.4% del total de genes) que incrementan (z-score > 2.0) y 503 genes (2.3%) que disminuyen (z-score < -2.0) su ET en respuesta al rizobio.

2. Análisis de las características de las secuencias de los 5'- UTR, 3'- UTR y CDS de los mRNAs con eficiencia traduccional diferencial en *M. truncatula* en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*

Las características de las secuencias de los mRNA y los elementos reguladores presentes en sus secuencias no codificantes 5'- UTR y 3'- UTR, contribuyen a modular la asociación de los mRNA con la maquinaria de traducción y, por lo tanto, afectan la ET de los mRNA (Lei et al., 2015; Munusamy et al., 2017; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Juntawong and Bailey-Serres, 2012; Juntawong et al., 2013a; Xu et al., 2017). Por esta razón, se realizó un estudio de las características de las secuencias de mRNAs que presentaron cambios en la ET en respuesta al rizobio (532 genes regulados positivamente y 503 regulados negativamente en presencia de rizobios, Traubenik et al, 2019) y se compararon con los parámetros de todos los mRNAs expresados en raíces de *M. truncatula*. Para ello se extrajeron las secuencias correspondientes a las CDS, 5'- UTR y 3'- UTR de todos mRNAs de *M. truncatula* a partir de la anotación del genoma versión Mt v4.0 y se calculó la longitud, el porcentaje GC y el cambio de energía libre de equilibrio (ΔG°) de cada una de estas regiones para todos los genes, para aquellos que incrementan y para aquellos que disminuyen su ET (**Figuras 24, 25, 26**)

Figura 24. Análisis de la longitud de la secuencia codificante (CDS) y de las regiones no traducidas (extremos 5'- UTR y 3'- UTR) de los mRNAs de genes con eficiencia traduccional diferencial, regulados positivamente (*Up*) o negativamente (*Down*) en *M. truncatula* en presencia de *S. meliloti*. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y el 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un *t*- test de dos colas con $P \leq 0,05$. El grupo “Todos” contiene las secuencias de todos los mRNA de *M. truncatula*, mientras que el grupo “ET Up” y “ET Down” contienen los mRNA de genes que muestran cambios positivos y negativos, respectivamente en la eficiencia traduccional (ET). Las letras a y b indican diferencias estadísticas significativas entre las medias.

El análisis del largo de las regiones CDS, 5' y 3'UTRs de los mRNAs con ET diferencial muestra que tanto los genes que son *Up* como *Down* regulados en respuesta al rizobio son más cortos, en promedio, que la media del total de los mRNA, tanto su secuencia codificante, como sus extremos no codificantes (**Fig. 24**). Los mRNAs que aumentan o disminuyen su TE en respuesta a los rizobios contienen CDS más cortas (712 ó 705 nts en promedio, respectivamente) que el promedio de todos los mRNA (979 nts). La longitud promedio de los extremos 5'- UTR de los genes regulados positivamente es de 156 nts, y la de los regulados negativamente es 176 nts, mientras que la longitud promedio de todos los 5'- UTR es de 231 nts. Con respecto a los 3'- UTR, las longitudes medias de los genes *Up* y *Down* regulados son 248 nts y 243 nts, respectivamente, mientras que la media de los 3'- UTR totales es 395 nts. Estos resultados sugieren que los mRNAs con regiones no traducidas más cortas son más susceptibles a sufrir cambios en la ET como consecuencia de la presencia del rizobio. Esta observación coincide parcialmente con lo observado previamente en *Arabidopsis* para genes que cambian su ET en respuesta a cambios en la iluminación o en la concentración de oxígeno, en donde se observó que los genes regulados presentaban 5'UTRs más cortos que la longitud promedio de todos los genes (Juntawong et al. 2012).

Figura 25. Análisis del contenido GC de la secuencia codificante (CDS) y de las regiones no traducidas (extremos 5'- UTR y 3'- UTR) de los mRNAs de genes con eficiencia traduccional diferencial en *M. truncatula* en presencia de *S. meliloti*. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y el 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un t- test de dos colas con $P \leq 0,05$. El grupo “Todos” contiene las secuencias de todos los mRNA de *M. truncatula*, mientras que el grupo “ET Up” y “ET Down” contienen los mRNAs de genes que muestran cambios positivos y negativos, respectivamente en la eficiencia traduccional (ET). Las letras a y b indican diferencias estadísticas significativas entre las medias.

El contenido de guanina y citosina (GC) de los 5'- UTR, CDS y 3'- UTR de los transcriptos regulados traduccionalmente fue menor que el promedio de todos los mRNA, mostrando una diferencia significativa tanto los mRNA *Up*, como los *Down* regulados (**Fig. 25**). Los valores promedio de GC de los 5'- UTR de los genes regulados fue de 0,33, un valor significativamente menor a la media del total de mRNA que fue de 0,35. Por su parte, las CDS de los genes *Down* regulados presentaron el menor porcentaje de GC (0,40), los mRNA *Up* regulados 0,41, mientras que el promedio del total de mRNA fue 0,42. Finalmente, también los extremos 3'- UTR de los genes con ET diferencial presentaron porcentajes GC menores a la media total (0,30 para genes *Up* regulados, 0,31 para genes *Down* regulados), en comparación con la media del total que fue de 0,32. Este resultado muestra que existe una correlación entre el porcentaje de GC de las regiones no traducidas de los mRNAs y la modulación de su traducción durante la simbiosis.

Figura 26. Análisis del ΔG° de la secuencia codificante (CDS) y de las regiones no traducidas (extremos 5'- UTR y 3'- UTR) de los mRNAs de genes con eficiencia traduccional diferencial en *M. truncatula* en presencia de *S. meliloti*. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y el 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un *t*- test de dos colas con $P \leq 0,05$. El grupo “Todos” contiene las secuencias de todos los mRNA de *M. truncatula*, mientras que el grupo “ET Up” y “ET Down” contienen los mRNA de genes que muestran cambios en la eficiencia traduccional (ET). Las letras a y b indican diferencias estadísticas significativas entre las medias.

El potencial para formar estructuras secundarias medidas como el cambio de energía libre en el equilibrio (ΔG°) de los 5'- UTR fue significativamente mayor para aquellos mRNAs cuyo ET aumenta o disminuye en respuesta a rizobios (-27 o -30 kcal/mol, respectivamente) que la estimada para todos los genes (-40 kcal/mol). Esto implica, que los 5'- UTR de los genes regulados son menos estructurados. Las estructuras secundarias en el extremo 5'- UTR de los mRNA afectan el escaneo de los ribosomas, y se cree que interfieren con la traducción del mRNA. Las secuencias codificantes de los genes regulados diferencialmente también presentaron ΔG° superiores (-196 Kcal/ mol y -187 Kcal/ mol para los *Up* y *Down* regulados, respectivamente) a la media del total de mRNAs (-278 Kcal/ mol), al igual que sus 3'- UTR (-45 y -48 kcal/ mol para los genes *Up* y *Down* regulados, respectivamente) que el promedio de todos los mRNA (-89 kcal/ mol). Es de destacar que el ΔG° promedio de los extremos 3'- UTR para todos los genes fue menor que el de los extremos 5'- UTR, revelando que los mRNA de *M. truncatula* tienden a ser más estructurados en su 3'- UTR que en su 5'- UTR, una característica descrita previamente en *Arabidopsis* (Kawaguchi et al., 2004).

Además, analizamos la posibilidad de encontrar una correlación entre el valor de ET de cada mRNA y las distintas propiedades analizadas anteriormente (**Figuras 27, 28, 29**).

Se compararon los datos de variación en la ET contra datos de longitud, contenido GC y ΔG° de los extremos no traducidos y el CDS, para el total de los mRNA, o de aquellos con variación positiva o negativa en sus ETs en presencia de rizobios. Este análisis mostró una correlación negativa entre la longitud de los transcritos y la ET, apoyando lo observado con la población de mRNAs *Up* o *Down* regulados, tanto en las regiones 5', 3' y CDS (**Fig. 27**). La variación en la ET también mostró correlación con el contenido GC (**Fig. 28**) y el ΔG° (**Fig. 29**) de los mRNAs individuales, lo que se refleja en mayores valores de “r” de los genes que cambian su ET respecto del total.

ET vs. Longitud (nts)

Figura 27. Análisis de correlación entre la Eficiencia Traduccional (ET) y la longitud de los mRNA. Se realizó el análisis de correlación de la ET de los transcritos, con respecto a los extremos no traducidos, y a los CDS. Se analizaron agrupados según si los mRNA presentaron un cambio positivo (ET *Up*), o negativo (ET *Down*) en su ET en presencia de rizobios. También se analizaron todos los mRNA (Todos). Debajo de cada gráfico se muestra el valor del coeficiente “r” de correlación de Pearson.

ET vs Contenido GC

Figura 28. Análisis de correlación entre la Eficiencia Traduccional (ET) y el contenido GC de los mRNA. Se realizó el análisis de correlación de la ET de los transcritos, con respecto a las regiones no traducidas, y a la región codificante (CDS). Se analizaron los mRNA que presentaron un cambio positivo (ET *Up*), o negativo (ET *Down*) en su ET en presencia de rizobios. También se analizaron todos los mRNA (Todos). Debajo de cada gráfico se muestra el valor del coeficiente “r” de Pearson.

Figura 29. Análisis de correlación entre la Eficiencia Traduccional (ET) y la energía libre de los mRNA. Se realizó el análisis de correlación de la ET de los transcritos, con respecto a las regiones no traducidas, y a la región codificante (CDS). Se analizaron los mRNA que presentaron un cambio positivo (ET *Up*), o negativo (ET *Down*) en su ET en presencia de rizobios. También se analizaron todos los mRNA (Todos). Debajo de cada gráfico se muestra el valor del coeficiente “*r*” de Pearson.

La suma de estos análisis muestra que los mRNAs más pequeños, con menor porcentaje GC y menos estructurados son los que sufren mayores cambios en su asociación a polisomas en respuesta a la presencia de rizobios, y el establecimiento de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno.

3. Búsqueda de secuencias consenso en los extremos 5'-UTR y 3'-UTR de los mRNAs de genes con eficiencia traduccional diferencial en *M. truncatula*

Para profundizar la caracterización de los extremos no codificantes de los mRNA de genes con ET diferencial, analizamos la posibilidad de que este grupo de genes presenten alguna característica intrínseca en sus secuencias que puedan diferenciarlos como grupo regulado traduccionalmente en presencia de rizobios. Para ello, se utilizó el algoritmo MEME (Bailey et al., 2006) para identificar secuencias en los extremos no codificantes de los grupos de genes con ET, tanto *Up* como *Down* regulados. Se obtuvieron 5 secuencias en cada análisis, de las cuales se consideraron relevantes aquellas que presentaron un valor estadístico $E < 1.10^{-3}$. No se encontraron motivos con valores estadísticos significativos dentro del 3'-UTR de genes con ET aumentado o disminuido, utilizando los parámetros predeterminados. Por otro lado, dentro de los 5'-UTR *Down* regulados en respuesta al rizobio, se identificó un motivo rico en pirimidinas (Y) de 21 nts (secuencia consenso: [CAU][UC][UC][UCA][UA][UC][UC][CU][UC][UC][UC][UC]UC[UA][CU][UC][CU]UC[AU]; valor $E = 1,6.10^{-42}$, **Fig. 30 A**). Los genes que contienen esta secuencia consenso fueron 35 (6,94 %), y fueron clasificados según su función, observándose una importante representación de las categorías de transporte y regulación transcripcional (6 genes cada categoría; Anexo II, Tabla A).

A

B

Figura 30. Secuencias consenso en mRNAs con eficiencia traduccional diferencial en presencia de *S. meliloti*. A. Se encontró un motivo consenso de 21 nts rico en pirimidinas (Y) en la región 5'-UTR de aquellos genes que disminuyen su eficiencia traduccional en presencia de rizobios ($E\text{-value}=1,6 \cdot 10^{-42}$). B. Por otro lado, las regiones 5'-UTR de los genes que aumentan su eficiencia traduccional en respuesta a rizobios, presentan una región de 15 nts rica en purinas (R) ($E\text{-value}= 4,1 \cdot 10^{-20}$).

Dentro de las categorías representadas por los genes que contienen el motivo rico en Y (**Fig. 30 A**), encontramos 6 genes implicados en el transporte transmembrana, 6 genes implicados en la regulación transcripcional como FAR1 (cambio en ET= -5,59), relacionado a la percepción de la luz roja lejana (Hudson et al., 1999), factores de transcripción de tipo MADS- Box (cambio en ET= -2,2), B3 (cambio en ET= -1,79), un factor de respuesta a etileno (ERF, cambio en ET= -2,02), así como también 4 genes relacionados a la degradación proteica, por ejemplo la subunidad reguladora 26S del proteasoma (cambio en ET= -2,41), una hidrolasa (cambio en ET= -1,5), una subunidad β de proteínas G triméricas (cambio en ET= -3,23), y tres genes de percepción y señalización, por ejemplo, un transportador de oligopéptidos (Medtr1g061120, cambio en ET= -3,49).

Del mismo modo, se encontró un motivo de 15 nts rico en purinas (R) en 36 genes (6,77 %), (secuencia consenso: [AG]A[GA][AG]AA[GAC]AAA[AG]A[AG][AG][AG]; valor $E= 4,1 \cdot 10^{-20}$) en el extremo 5'-UTR de genes cuya ET aumentó en respuesta a la inoculación (**Fig. 30 B**). Las principales categorías representadas por los genes que contienen esta

secuencia son transporte (5 genes), percepción y señalización (4 genes), y metabolismo (4 genes), (Anexo II, Tabla B).

4. Búsqueda de motivos regulatorios en los extremos UTR de los mRNA de genes involucrados en la vía del NF

La eficiencia traduccional es influenciada o controlada en parte por la presencia de sitios de reconocimiento para RBPs o sRNAs también se ha descrito como responsable de la modulación de la traducción en respuesta a estímulos (Merchante et al., 2017). Es por ello que analizamos la presencia de sitios de unión de RBPs en los mRNA de los genes involucrados en la vía del NF que pudieran influir en su regulación conjunta, como un regulón. La búsqueda se concentró en las secuencias de las regiones 5' y 3' UTR en busca de motivos reguladores ya descritos en otros trabajos, utilizando la herramienta web *ITB Tools* (Grillo et al., 2009).

Se encontró un sitio de unión a UNR (**UNR binding site**) en los extremos 5'-UTR de los genes *NF-YA1* y *CRE1* (Anexo II, Tabla C). *Upstream of N-ras (UNR)* es una proteína citoplasmática que contiene 5 dominios **Cold Shock (CSD)**. Las proteínas de la familia CSD realizan una variedad de funciones y se cree que se comportan como chaperonas de RNA, promoviendo una conformación lineal del mRNA. En humanos, la UNR ha sido implicada en la desestabilización del mRNA de *c-fos* (Chang et al., 2004), pero también en la activación de la traducción de una serie de transcritos dirigida por secuencias **IRES (Inner Ribosome Entry Site)**, incluidos *rinovirus* (Hunt et al., 1999), *poliovirus* (Boussadia et al., 2003), y el factor proapoptótico *Apaf-1* (Mitchell et al., 2003), entre otros. Además del dominio UNR-bs, en *NF-YA1* también se encontró un motivo IRES. Los motivos IRES se encuentran en el 5' UTR de muchos genes. Es un mecanismo alternativo para la traducción específica de mRNA cuando el factor temprano de Inicio de la traducción 4F (**eIF4F**) está desfosforilado, e impide el inicio de la traducción convencional (Le and Maizel, 1997). La presencia de un IRES en el 5' UTR de *NF-YA1* sugiere que el inicio de la traducción de este factor de transcripción podría ocurrir a través de un mecanismo independiente del cap y controlado por la proteína UNR (**Fig. 31 A**).

Además de *NF-YA1*, el cual es fundamental en células del córtex para la activación del ciclo celular y consecuente organogénesis del nódulo, el gen del factor transcripcional *IPD3* también presenta un motivo IRES (posición 483- 580). *IPD3* inicia la activación jerárquica de otros factores de transcripción que desencadenan los cambios transcripcionales requeridos en epidermis para la simbiosis. Además, induce la expresión del factor de transcripción *NIN*, el cual es requerido tanto para la formación de ITs en epidermis, como para la organogénesis del nódulo en córtex (**Fig. 6**).

Otra característica de los mRNAs que se relaciona con la traducción es la presencia de marcos abiertos de lectura aguas arriba (**uORF**, *upstream Open Reading Frame*). Los uORFs son regiones cortas que codifican polipéptidos y que se ubican aguas arriba del ORF principal (**mORF**, *main ORF*) en los 5'- UTR, influyendo negativamente en la traducción del mORF (von Arnim et al., 2014). En todos los genes de la vía de NF analizados, se encontraron posibles uORFs, los cuales están asociados a una regulación negativa del mORF, y pueden inducir la unión de ribosomas traduccionalmente activos y comenzar la traducción en una posición alternativa al codón de inicio principal (**Fig. 31 A**, Anexo II, Tabla C).

A

B

Figura 31. Motivos reguladores en los extremos no traducidos de los mRNA de genes involucrados en la vía del NF. Se utilizó la herramienta web *ITBTools* (Grillo et al., 2009) para la búsqueda de secuencias reguladoras conocidas sobre los extremos no traducidos de los mRNA de genes involucrados en la vía del NF. En el esquema se representan los diferentes motivos encontrados con cajas de diferentes colores. **A.** Esquema de los extremos 5'- UTR de los genes analizados. **B.** Esquema de los extremos 3'- UTR de los mismos genes. Los genes *NFP* y *NF-YA1* no presentaron el sitio PAS (P).

Sobre el análisis de los extremos 3'- UTR, todos los genes presentan el motivo **PAS** (*Poly Adenylation Site*) (Beaudoing et al., 2000), a excepción de los transcritos de los genes *NFP* y *NF-YA1* (**Fig. 31 B**, Anexo II, Tabla C). Existen mRNAs que no son poliadenilados durante su maduración, por ejemplo, la síntesis canónica de histonas (Zhang et al., 2014; Marzluff et al., 2008). Sin embargo, los resultados presentados en el capítulo I fueron obtenidos a partir de cDNA sintetizado con oligo *d(T)*, lo que implica que los mRNAs de *NF-YA1* y *NFP* presentan cola poli (A). Es posible que estos genes posean sitios de corte y poliadenilación no canónicos

Por otro lado, analizamos la presencia de características que fueron encontradas en trabajos previos sobre los mRNA que se concentran en SGs, o en PBs. Khong y colaboradores (2017) describieron la población de RNAs asociada a los *Cores* de SGs de células humanas y de levaduras. Los mRNAs concentrados en SGs presentaban las siguientes características: (1) la longitud de los transcritos (7,1 Kb) era mayor a la longitud de los mRNA que no se asocian a SGs (4,2 Kb), incluso los que están ausentes en SGs presentan una longitud promedio mucho menor (2,1 Kb); (2) tanto el CDS como el extremo 3'- UTR presentaban mayor longitud, y parecen ser las características más influyentes para el reclutamiento de los mRNA a SGs, no así el extremo 5'- UTR.

Con respecto a los transcritos concentrados en PBs, Hubstenberger y colaboradores (2017), describieron que existe una longitud variable de las colas poli (A) de los mRNA encontrados en PBs. Sin embargo, la ausencia de PABPs en PBs, la tendencia de la proteína componente de PBs DDX6 a unir mRNA de colas poli (A) pequeñas, sumado a la observación de una caída importante en las lecturas de secuenciación sobre los extremos 3'- UTR, sugieren la posibilidad de encontrar mayor proporción de transcritos con colas más cortas en PBs, que los depletados, o los que no presentan ninguna selección.

Teniendo en cuenta que los mRNAs que presentan una longitud mayor a la media tienden a agruparse en SGs, y que la extensión del CDS y el extremo 3'-UTR juegan un rol primordial para su presencia en este gránulo, comparamos estas características en los transcriptos de los genes de la vía del NF con respecto a los valores promedio de los mRNA totales en *M. truncatula* (Tabla 7).

Tabla 7. Longitud de los mRNA, variación de la ET y variación en SGs y PBs de algunos de los genes implicados en la vía del NF.

	Longitud 5'-UTR	Longitud CDS	Longitud 3'-UTR	Longitud total del transcripto ^a	ET ^b	RIP ^c SGs	RIP ^c PBs
NFP	159	1788	265	2212	0,314		
DMI1	239	2649	486	3374	0,687	3,46	4,38
DMI2	422	2778	420	3620	0,158	0,16	4,68
DMI3	99	1572	703	2374	0,05		
IPD3	580	1560	325	2465	0,18		
CRE1	1097	3012	483	4592	-0,11		
NF-YA1	339	999	510	1848	0,754	1,11	0,11
NSP1	149	1665	438	2252	-0,059	0,003	2,79
NSP2	223	1527	236	1986	-0,096	0,72	6,25
NIN	141	2802	277	3220	-0,149		
Media, Total mRNA	231	979	395	1605			

^a: Los datos de las longitudes de los extremos 5'-UTR, 3'-UTR, CDS y total de los mRNA fue medida en nts.

^b: Eficiencia Traduccional medida desde datos de transcriptoma como Log₂ Fold Change ET (Sm/mock), (Reynoso et al., 2013a; Traubenik et al., 2019).

^c: Cociente entre la variación de la abundancia de mRNA unidos a SGs o PBs, sobre la variación de la abundancia de mRNA totales en cada muestra (CAP I, Tabla 4).

Todos presentan una longitud total del transcripto y una longitud del CDS mayor a la media del total de mRNA en *M. truncatula*. También presentan una longitud mayor de su extremo 3'-UTR, a excepción de los transcriptos de los genes *NFP*, *NF-YA1*, *IPD3* y *NSP2*. Estos datos son compatibles con una posible localización de los mRNA correspondientes a los genes *DMI1*, *DMI2*, *DMI3*, *CRE1*, *NSP1* y *NIN* en SGs. *NFP*, *NF-YA1*, *IPD3* y *NSP2*, que tienen 3'-UTR menores a la media, podrían concentrarse en otro gránulo diferente a SGs. Apoyando esta idea, puede observarse que los genes *NSP2* y *NF-YA1* presentan una disminución de su abundancia en PBs en presencia de rizobios (Tabla 7, Fig. 23). Por otra parte, nos preguntamos si la longitud de las regiones codificante y no traducida de los mRNAs de los genes de la vía del NF tenía correlación con su ET (Tabla 7, Fig. 32).

Figura 32. Correlación de la longitud de los transcritos de los genes de la vía del NF, y su Eficiencia Traduccional (ET). Se analizó la posibilidad de una correlación entre los datos de ET de los mRNA de los genes implicados en la vía del NF y la longitud de sus regiones no traducidas 5'- UTR, 3'- UTR, su secuencia codificante (CDS), o su longitud total. Los valores del coeficiente "r" de correlación de Pearson fueron: -0,138, -0,283, 0,245 y -0,235 para las comparaciones ET vs 5'- UTR, CDS, 3'- UTR y longitud mRNA total, respectivamente.

Lo que puede observarse es que existe una tendencia a un aumento en la ET de los genes de la vía del NF, cuanto menor es su longitud total ($r = -0,235$), al mismo tiempo que presentan extremos 3'- UTR más largos ($r = 0,245$).

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Como mencionamos anteriormente, los mRNAs presentan una serie de características intrínsecas que determinan la eficiencia de su traducción (Von Arnim et al., 2014). Estas características incluyen a las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, el cap 7-metil guanosina (m7GpppN) en el 5' y la cola de poli (A). Además, la estructura secundaria adoptada por un mRNA también puede tener una fuerte influencia sobre sus niveles de traducción. Por ejemplo, la formación de horquillas y pseudonudos (*pseudoknots*) en el extremo 5' bloquean la traducción si el ribosoma cargado no puede traspasar esas estructuras (Merchante et al., 2017). En este capítulo, hemos caracterizado a los mRNA de aquellos genes de *M. truncatula* que presentan un comportamiento traduccional diferencial cuando las plantas son inoculadas con *S. meliloti*. Hemos encontrado que la longitud de los mRNAs, el contenido GC, y la estructura secundaria, tanto de sus secuencias no traducidas como de las codificantes, están correlacionadas con su eficiencia traduccional, sugiriendo que estos parámetros influyen en la asociación de los transcriptos a los polisomas en el contexto de la reprogramación génica y la modulación de su traducción durante la simbiosis (**Figs. 24- 29**).

El análisis de las características de los mRNA que tienden a ser más susceptibles a la regulación traduccional durante la simbiosis del nódulo de raíz muestra que en general son transcriptos más cortos, tanto en sus extremos no traducidos, como en sus CDS (**Fig. 24**). Esta observación coincide con lo descrito anteriormente en maíz para mRNAs con ET positiva en condiciones de sequía (Lei et al., 2015). Con respecto al largo del extremo 5'-UTR, se ha descrito en *Arabidopsis* una extensión promedio de 124,7 nts, y que existe una longitud óptima entre 50- 75 nts para la carga de polisomas, donde longitudes <25 nts, o >175 nts presentan una caída significativa en la eficiencia traduccional (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). Nuestros datos indican que el promedio del extremo 5'-UTR en *M. truncatula* es de 231 nts, y que los genes *Up* regulados presentan la longitud óptima para la carga de ribosomas (156 nts), y longitudes mayores como la mostrada por los genes *Down* regulados (176 nts), implicarían una disminución de la carga de ribosomas para la traducción, en presencia de rizobios.

Tanto los mRNA *Up* como los *Down* regulados, presentan extremos 5'-UTR y 3'-UTR menos estructurados con respecto a la media de todos los mRNA de *M. truncatula*, es

decir, presentan valores más altos de ΔG° (**Figs. 25, 26**). Comparativamente, y en concordancia con lo observado en *Arabidopsis*, los extremos 3'-UTR de todos los mRNA de *M. truncatula*, incluso también los genes *Up* y *Down* regulados, presentan menor contenido GC, y mayor capacidad de formación de estructuras secundarias que los extremos 5'-UTR (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). Sin embargo, se cree que la longitud tendría mayor influencia que la estructura secundaria del 3'-UTR sobre la regulación de la traducción, ya que un extremo 3'-UTR más corto dificultaría el reciclado de los ribosomas y por tanto el reinicio de la traducción (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). Por su parte, nuestro análisis de correlación indica que la mayor estabilidad de las estructuras secundarias formadas en las CDS y el 3'-UTR también tendrían influencia en la regulación negativa de los genes *Down* regulados (**Fig. 29**).

Con respecto a la búsqueda de motivos conservados de regulación, el motivo rico en purinas (**Fig. 30 B**) se encontró en 36 genes (6,77 %). Estos genes representan a 10 categorías según su función biológica, donde transporte, metabolismo y percepción y señalización son las más representadas (Anexo II, Tabla B). En particular, un miembro de la familia F-box 1 (EBF1) que produce la ubiquitinación de *Ethylene Insensitive 3 (EIN3)*, (Medtr4g114650, ET=2,634), contiene 5 repeticiones de este motivo rico en R en su 5'-UTR. EBF1 es un regulador negativo de la señalización o respuesta de etileno y la ET de su mRNA aumentó más de 6 veces en respuesta al rizobio (Anexo II, Tabla B). En la misma línea, el gen (Medtr8g099215, ET= -2,02) que es *Down* regulado y contiene el motivo rico en Y, es un factor de respuesta a etileno. Dado que el etileno es un regulador negativo de la nodulación (Penmetza and Cook, 1997), estos resultados establecen un vínculo interesante entre la regulación traduccional y la supresión mediada por etileno de la infección y/ o los programas de desarrollo del nódulo. Algunos de los genes involucrados en la vía del NF presentan también la secuencia rica en purinas en sus regiones 5'. *CRE1* presenta 4 posibles repeticiones de este motivo en las posiciones 362, 366 (se superpone con el primero), 410, y 1062, mientras que *DMI1* presenta tres posibles repeticiones solapadas en las posiciones 42, 38 y 48. *DMI2* e *IPD3* presentan una repetición de este motivo en las posiciones 310, y 366, respectivamente (Anexo II, Tabla D).

Llamativamente, en *A. thaliana* se describió un motivo muy similar rico en purinas de 15 nts en los 5'-UTR de mRNAs *Up* regulados en la respuesta de defensa frente a patógenos (Xu et al., 2017). Este motivo rico en purinas (denominado motivo “R”) tiene un efecto combinado con motivos uORF, que genera un efecto aditivo sobre la regulación traduccional de los mRNA que los contienen, sugiriendo que el control traduccional por ambas secuencias (motivo R y uORFs) se daría por diferentes mecanismos. El sistema mejor descrito de regulación de la traducción en condiciones de estrés involucra la fosforilación del factor de iniciación de la traducción **eIF2 α** mediada por diferentes quinasas (Hinnebusch, 2005; Sidrauski et al., 2015). Sin embargo, esta vía no sería necesaria para la traducción o resistencia frente a patógenos en *Arabidopsis*, lo que sugiere un mecanismo alternativo en la reprogramación traduccional inducida por el sistema inmune en plantas (Xu et al., 2017). La hipótesis sobre la forma en la que el motivo R afecta la traducción propone que las proteínas **PABs** se unen, además de a las colas poli (A) de los transcritos, a secuencias ricas en A ubicadas en las secuencias 5'-UTR para inhibir la traducción (Patel et al., 2005). Entre los genes *Up* regulados que presentaron el motivo rico en purinas en nuestro trabajo, no se encuentra ninguno relacionado a defensa o respuesta inmune; sin embargo, se puede especular que exista un mecanismo similar de regulación traduccional para la nodulación, disparado por la presencia de rizobios dada la alta similitud de los motivos.

No existe hasta el momento, según nuestro conocimiento, registro de una secuencia reguladora rica en pirimidinas. En este trabajo encontramos entre los genes *Down* regulados a nivel traduccional, un motivo rico en pirimidinas en sus 5' UTR (**Fig. 30 A**). Uno de los genes *Down* regulados que presentó en su extremo 5'-UTR el motivo rico en Y corresponde a un gen que codifica para un transportador de oligopéptidos (Medtr1g061120, ET= -3,49). Esta proteína es importante para el transporte de aminoácidos, cumpliendo un rol en el desarrollo de tejidos (Hinnebusch, 2005). Es interesante observar la fuerte regulación negativa que presenta este transportador en presencia de rizobios, teniendo en cuenta su función en la provisión de nitrógeno a los tejidos en desarrollo. La regulación de este gen podría relacionarse con el cambio de la fuente de nitrógeno que se da cuando se establece la interacción simbiótica, en ausencia de nutrientes obtenidos por absorción desde el exterior de la planta (Delrot et al., 2000).

La escasa correlación entre el transcriptoma y el traductoma de *M. truncatula* frente a la inoculación con su simbionte *S. meliloti* sugiere que la regulación postranscripcional juega un rol importante en la reprogramación de la expresión génica en la planta durante la interacción simbiótica (Traubenik et al., 2019). Es aquí donde los mRNPs citoplasmáticos SGs y PBs aparecen como protagonistas fundamentales, secuestrando o liberando mRNA de acuerdo a los requerimientos celulares. Este tráfico de mRNAs que pueden ser conservados en citoplasma sin ser traducidos, podrían explicar, en parte, los cambios observados en la ET de muchos genes, incluidos los involucrados en la vía del NF.

El análisis de los elementos presentes en los mRNAs de los genes que forman parte del *Nod pathway* sugiere que los factores de transcripción *NF-YA1* e *IPD3* podrían tener un mecanismo de regulación traduccional adicional al resto de los genes implicados en la vía del NF, determinado por la presencia de motivo IRES en sus secuencias 5' no traducidas (**Fig. 31 A**). Teniendo en cuenta que ambos genes son activados luego del *calcium spiking*, el control fino de los niveles de estas proteínas a nivel de la traducción podría dar especificidad al reconocimiento de esta señal clave para el programa genético de la simbiosis. Una posible vía involucrada a este control traduccional podría ser a través de la proteína UNR, y el inicio de la traducción a partir de la secuencia IRES en el 5'-UTR, que es una vía de traducción alternativa e independiente de la vía canónica dependiente del complejo de unión al *cap* (**CAP-binding Complex, CBC**) (Chantarachot and Bailey-Serres, 2017; Browning and Bailey-Serres, 2015).

La ausencia del motivo PAS en los 3'-UTR de los mRNA de los genes *NF-YA1* y *NFP* podría explicarse porque el algoritmo utilizado para su detección *in silico* no lo haya identificado, aun estando presente (**Fig. 31 B**). Como mencionamos en el capítulo anterior, hemos detectado y cuantificado el mRNA de *NF-YA1* y *NFP* a partir de cDNA sintetizado con oligo *d(T)* (Reynoso et al., 2013a), lo que indica que estos mRNA poseen extremos de poliadenina. Dentro de los genes analizados en el Capítulo I, *NF-YA1* es el único gen de la vía del NF cuyos mRNAs son movilizados desde PBs hacia polisomas y SGs en presencia de rizobios. Si tenemos en cuenta la caracterización del transcriptoma de PBs en humanos, que mostró una concentración de mRNA de colas poli (A) más cortas (Hubstenberger et al., 2017), podríamos suponer que los mRNA de *NF-YA1* presentan

colas poli (A) cortas, y se concentran en PBs. Resultaría interesante realizar el mismo análisis de distribución de los mRNA de *NFP* en mRNPs realizado en el Capítulo I, y relacionar la ausencia del motivo PAS con la concentración de los mensajeros en PBs.

Capítulo III

Caracterización de los mRNAs regulados diferencialmente en P. vulgaris en respuesta a diferentes cepas de R. etli

Resultados y Discusión

En este capítulo se abordó el cuarto objetivo específico propuesto en esta Tesis Doctoral. Haciendo uso de datos de transcriptómica generados por RNA-seq y disponibles en el laboratorio (Clúa, 2018) analizamos las características de los promotores y los mRNAs (longitud, contenido de guanina citosina, estructura del 5'-UTR, CDS y 3'-UTR) de aquellos genes de *P. vulgaris* que evidenciaron una expresión diferencial frente a diferentes cepas de *R. etli* que exhiben distinto grado de eficiencia en la simbiosis fijadora de nitrógeno. Se buscaron los elementos regulatorios presentes en el DNA y en el RNA que puedan dar cuenta de la modulación de dichos genes durante la fijación biológica de nitrógeno actuando en los distintos niveles posibles de regulación (transcripcional y post-transcripcional).

1. Análisis de los genes con expresión diferencial

Previamente en el laboratorio se generaron datos del transcriptoma de *P. vulgaris* cultivar mesoamericano NAG12 y del cultivar andino Alubia inoculados con las cepas de *R. etli* **SC15** o **CE3**, las cuales portan el alelo tipo $-\alpha$ del gen *nodC* (de acá en adelante se nombrarán como cepas α), o inoculados con las cepas **55N1** o **124N1**, las cuales poseen el alelo tipo $-\delta$ (de acá en adelante cepas δ) (**Fig. 33**). Estudios previos del laboratorio demostraron que los cultivos mesoamericanos establecen una relación preferencial y más eficiente con las cepas α en comparación con las cepas δ , lo cual se refleja en un mayor número de nódulos y mayor formación de biomasa (Peltzer Meschini et al., 2008; Aguilar et al., 2004). Ensayos de coinoculación mostraron que las cepas α forman más nódulos que las cepas δ en cultivos mesoamericanos pero no en los andinos, sugiriendo que existen genes de la planta que participan en la selección de cepas más eficientes (Aguilar et al., 2004). El genoma de referencia utilizado para el alineamiento de las lecturas de RNA-Seq fue el de una variedad andina de *P. vulgaris* de la variedad G19833, el único completo y caracterizado disponible al momento del análisis (Schmutz et al., 2014).

Figura 33. Esquema del diseño experimental utilizado. Plantas de *P. vulgaris* NAG12 y Alubia fueron inoculadas con el medio de crecimiento bacteriano (YEM) como control o con las cepas de *R. etli* SC15, CE3, 55N1 y 124N1. Mientras que el cultivar NAG12 presenta una preferencia por la simbiosis con cepas de *R. etli* que portan el alelo tipo -δ del gen *NodC* (cepas SC15, CE3), el cultivar Alubia lo hace con cepas que portan el alelo tipo -α (cepas 55N1 y 124N1). A las 24 hpi se colectó el tejido, se extrajo el RNA total de tres réplicas biológicas por condición, se purificó el RNA poliadenilado, y se construyeron las bibliotecas para la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq). Los datos generados fueron analizados *in silico* para identificar genes con expresión diferencial (Clúa, 2018).

La combinación de interacciones de diferentes cepas y cultivares de poroto permitió obtener información sobre las variaciones de los niveles de mRNA en respuesta a cada cepa de rizobio. En esta sección nos enfocamos en el análisis de las características que presentan los genes que ven afectada su abundancia a nivel de transcritos cuando la combinación es la más eficiente en términos del número de nódulos generados. Los genes de *P. vulgaris* NAG12 se dividieron en tres grupos: el grupo denominado “*Todos*”, que contiene a todos los genes de poroto que presentaron lecturas en los datos de RNA-Seq analizados; el grupo “*4 cepas*”, que contiene a los genes que mostraron la misma tendencia en su regulación diferencial en presencia tanto de cepas de tipo -α, como de cepas tipo -δ. Finalmente, el grupo “*Cepas alfa*”, que contiene a aquellos genes que sólo mostraron regulación diferencial en presencia de rizobios α y no mostraron diferencia de expresión frente a las cepas δ. El criterio para clasificar a los genes como expresados diferencialmente (**GED**) fue el siguiente: que presenten un Log₂ de la tasa de cambio (**Fold Change, FC**) mayor a 1 (regulados positivamente, *Up*) o menor a -1 (regulados negativamente, *Down*) entre muestras control (inoculadas con medio YEM) y muestras inoculadas con rizobio, y un valor de probabilidad $p \leq 0,05$. Sólo se consideraron los genes que mostraron un valor de FPKM >1 en al menos una muestra. La unidad utilizada para la cuantificación fue FPKM, descrita en el Capítulo II.

El número total de genes que se expresaron diferencialmente en NAG12 sumando todas las combinaciones posibles fue de 1020, de los cuales 729 fueron *Up* regulados, y 291 fueron *Down* regulados. De estos, 156 genes respondieron a las cuatro cepas (104 *Up* regulados, 52 *Down* regulados). Este grupo de genes formaría parte de una respuesta molecular común a tiempos tempranos de la inoculación frente a distintas cepas de rizobios. Por otro lado, 81 genes respondieron solamente a las cepas tipo $-\alpha$ (68 genes *Up* regulados, 13 *Down* regulados). Este grupo de genes son los que podrían tener influencia en la preferencia de cepas y quizás también en la mayor eficiencia de nodulación en el cultivar mesoamericano NAG12.

Teniendo en cuenta que los niveles estacionarios de mRNA medidos a través de los estudios transcriptómicos representan un balance entre la síntesis y la degradación, estudiamos los elementos *cis* presentes en los promotores de los genes con expresión diferencial, así como las características de los mRNAs que pueden estar relacionados con la degradación de mensajeros. De esta forma caracterizamos elementos del DNA relacionados con el nivel de regulación transcripcional y elementos del RNA asociados a la regulación post-transcripcional.

2. Elementos de regulación asociados a la nodulación eficiente

A partir de los genes expresados diferencialmente identificados usando el genoma andino de referencia, realizamos una búsqueda local por homología contra el genoma de la variedad mesoamericana BAT93, cuyas secuencias se encuentran disponibles en formato FASTA, pero que no cuenta con una anotación funcional o una interface para su acceso (Vlasova et al., 2016). Los datos de los genes identificados en la variedad mesoamericana se presentan en la Tabla A del Anexo III.

Con el fin de identificar los elementos regulatorios presentes en los promotores de los genes corregulados, se realizó un análisis utilizando el algoritmo disponible en el *Plant Transcriptional Regulatory Map* (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>), un sitio web que provee información sobre factores de transcripción de plantas, elementos *cis* regulatorios presentes en los promotores y herramientas de análisis para comprender las redes regulatorias que operan a nivel transcripcional en plantas. Utilizando las

regiones de los promotores correspondientes a los genes que responden a las cuatro cepas o sólo a las de tipo α , realizamos un análisis con *Regulation Prediction*, una herramienta que infiere las interacciones potenciales entre los elementos regulatorios y los factores de transcripción que poseen sitios de unión sobrerrepresentados en el *input* (promotores de los genes corregulados). La lista de elementos regulatorios para los promotores provenientes de cada uno de los grupos (*4 cepas* y *Cepas Alfa*) se muestran en el Anexo III, Tabla B. De esta manera se obtuvieron los promotores de 18 y 92 genes *Down* y *Up* regulados, respectivamente, en el grupo *4 cepas*; mientras que en el grupo *Cepas Alfa* se obtuvieron los promotores de 10 y 64 genes *Down* y *Up* regulados, respectivamente.

El análisis de las redes regulatorias mostró que los genes *Up* regulados presentaron un menor número de familias y de miembros dentro de cada familia de factores de transcripción involucrados en su regulación en comparación con los *Down* regulados. Esto sugiere que los genes cuyos niveles de transcriptos aumentan en respuesta a la inoculación con rizobios, son controlados por una red regulatoria compuesta por un número acotado de factores de transcripción. Por otro lado, a pesar de ser muchos menos, los genes *Down* regulados, contienen una mayor diversidad de elementos *cis* en sus promotores tanto para el grupo *4 cepas* como para el de *Cepas Alfa* (Tablas 8-11).

En particular, en el caso de la respuesta a *Cepas Alfa* se identificaron 47 sitios de unión a miembros de la familia TCP (Tabla 8). Los factores transcripcionales TCP contienen un dominio de unión al DNA de tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH) a través del cual regulan diferentes procesos de desarrollo en plantas y respuestas de defensa frente a patógenos (Li, 2015). En contraposición, los genes *Up* regulados en respuesta a todas las cepas contienen elementos de unión a factores de transcripción de tipo ERF, HSF, MYB y WRKY (Tabla 10), sugiriendo que la respuesta general a rizobios es controlada por reguladores transcripcionales diferentes a los que participan de la preferencia de cepa.

Los genes *Down* regulados contienen gran cantidad de elementos de respuesta en sus promotores que corresponden a diversas familias de factores transcripcionales. Las familias BES1, bHLH, bZIP, ERF, MYB y NAC aparecen representadas en los genes cuyos transcriptos disminuyen tanto en la respuesta general a rizobios (*4 cepas*) como a las

específicas de *Cepas Alfa* (**Tablas 9 y 11**). En el caso de la respuesta a 4 cepas, también aparecen los elementos de unión de factores TCP (**Tabla 11**), mientras que en el grupo *Cepas Alfa* existen elementos de reconocimiento de C2H2 (**Tabla 9**). Este resultado muestra que los factores de transcripción involucrados en ambas respuestas comparten una red regulatoria común, aunque también existen elementos específicos de cada una de ellas en los genes *Down* regulados.

Tabla 8. Elementos *cis* enriquecidos en los promotores de los genes *Up* regulados en respuesta a las cepas *nodC-α* y los posibles factores de transcripción involucrados en su reconocimiento.

TF	Familia	Background bind ^a	Query bind ^b	P value
Phvul.008G157600	GATA	456	3	2.25E ⁻²
Phvul.004G163300	HSF	827	5	1.31E ⁻²
Phvul.008G183700	MIKC_MADS	1210	6	2.32E ⁻²
Phvul.005G035900	MIKC_MADS	1232	6	2.53E ⁻²
Phvul.007G210600	SBP	309	2	3.64E ⁻²
Phvul.003G190900	TCP	2849	12	1.42E ⁻²
Phvul.004G072100	TCP	4209	15	3.20E ⁻²
Phvul.001G089100	TCP	2927	11	3.87E ⁻²
Phvul.010G089100	TCP	2342	9	4.61E ⁻²

^a: cantidad de promotores que contienen sitios de unión en su secuencia en todo el genoma de *P. vulgaris* (27197 promotores). Como background se tomaron los 1500 nts *upstream* del sitio de inicio de la traducción de todos los genes de *P. vulgaris*.

^b: cantidad de sitios de unión encontrados en los promotores analizados (64).

Tabla 9. Elementos *cis* enriquecidos en los promotores de los genes *Down* regulados en respuesta a las cepas *NodC-α* y los posibles factores de transcripción involucrados en su reconocimiento. BES1, bHLH, bZIP, C2H2, ERF, MYB y NAC.

TF	Familia	Background bind ^a	Query bind ^b	P value
Phvul.008G052000	AP2	12545	8	5.52E ⁻³
Phvul.001G016100	BES1	2048	2	3.43E ⁻²
Phvul.002G123700	BES1	2079	2	3.56E ⁻²

Phvul.005G079400	BES1	1689	2	$2.06E^{-2}$
Phvul.001G031300	bHLH	2930	3	$1.66E^{-2}$
Phvul.002G017600	bHLH	2182	3	$5.85E^{-3}$
Phvul.003G037600	bHLH	2416	3	$8.42E^{-3}$
Phvul.003G072000	bHLH	3161	3	$2.15E^{-2}$
Phvul.003G181900	bHLH	2117	3	$5.25E^{-3}$
Phvul.007G206000	bHLH	2400	3	$8.22E^{-3}$
Phvul.007G272600	bHLH	1528	2	$1.58E^{-2}$
Phvul.009G207000	bHLH	1558	3	$1.70E^{-3}$
Phvul.001G212800	bZIP	1852	2	$2.63E^{-2}$
Phvul.004G045800	bZIP	1708	3	$2.40E^{-3}$
Phvul.008G023800	bZIP	1843	2	$2.60E^{-2}$
Phvul.007G139600	C2H2	3625	4	$5.90E^{-3}$
Phvul.008G270400	C2H2	11437	7	$1.73E^{-2}$
Phvul.009G070800	C2H2	3341	3	$2.59E^{-2}$
Phvul.005G161200	Dof	7227	5	$2.66E^{-2}$
Phvul.009G186600	Dof	3769	3	$3.86E^{-2}$
Phvul.001G023700	ERF	2639	3	$1.15E^{-2}$
Phvul.002G035900	ERF	5821	4	$4.30E^{-2}$
Phvul.006G047800	ERF	3088	3	$1.98E^{-2}$
Phvul.006G179700	ERF	3572	3	$3.24E^{-2}$
Phvul.008G165000	ERF	4045	3	$4.86E^{-2}$
Phvul.009G029600	ERF	2118	2	$3.74E^{-2}$
Phvul.005G011700	FAR1	1872	2	$2.71E^{-2}$
Phvul.007G043200	FAR1	1628	2	$1.87E^{-2}$
Phvul.003G203600	LBD	4733	4	$1.85E^{-2}$
Phvul.006G169600	MIKC_MADS	1713	2	$2.14E^{-2}$
Phvul.003G013600	MYB	1069	2	$5.91E^{-3}$
Phvul.003G176800	MYB	1226	2	$8.64E^{-3}$
Phvul.004G090900	MYB	961	2	$4.38E^{-3}$
Phvul.007G215800	MYB	1108	2	$6.53E^{-3}$
Phvul.008G107000	MYB	1326	2	$1.07E^{-2}$
Phvul.009G075000	MYB	3577	3	$3.25E^{-2}$
Phvul.004G171200	MYB_related	942	2	$4.14E^{-3}$

Phvul.001G059900	NAC	879	2	$3.41E^{-3}$
Phvul.001G100200	NAC	1383	2	$1.20E^{-2}$
Phvul.007G085600	NAC	1234	2	$8.80E^{-3}$
Phvul.007G089600	NAC	1114	2	$6.62E^{-3}$
Phvul.007G140500	NAC	1754	2	$2.28E^{-2}$
Phvul.009G008000	NAC	1037	2	$5.42E^{-3}$
Phvul.009G150100	NAC	1158	3	$5.59E^{-4}$
Phvul.005G181800	WRKY	1474	3	$1.39E^{-3}$
Phvul.008G251300	WRKY	1090	2	$6.23E^{-3}$

^a: cantidad de promotores que contienen sitios de unión en su secuencia en todo el genoma de *P. vulgaris* (27197 promotores). Como background se tomaron los 1500 pb *upstream* del sitio de inicio de la traducción de todos los genes de *P. vulgaris*.

^b: cantidad de sitios de unión encontrados en los promotores analizados (10).

Tabla 10. Elementos *cis* enriquecidos en los promotores de los genes *Up* regulados en respuesta a las 4 cepas de *R. etli* y los posibles factores de transcripción involucrados en su reconocimiento.

TF	Familia	Background bind ^a	Query bind ^b	P value
Phvul.001G111800	ERF	2573	17	$2.24E^{-3}$
Phvul.009G225000	ERF	2584	14	$2.65E^{-2}$
Phvul.002G137300	G2-like	652	5	$2.34E^{-2}$
Phvul.004G143500	HD-ZIP	654	5	$2.37E^{-2}$
Phvul.001G154700	HSF	1294	8	$3.10E^{-2}$
Phvul.002G155300	HSF	1138	10	$1.59E^{-3}$
Phvul.009G065800	HSF	1369	8	$4.20E^{-2}$
Phvul.008G028000	MYB	951	6	$4.23E^{-2}$
Phvul.008G038600	MYB	339	3	$2.82E^{-2}$
Phvul.009G106700	MYB	688	5	$2.93E^{-2}$
Phvul.007G071900	Nin-like	1389	10	$7.18E^{-3}$
Phvul.001G060200	WRKY	1085	10	$1.09E^{-3}$
Phvul.001G088200	WRKY	1031	8	$8.16E^{-3}$
Phvul.002G016100	WRKY	1081	7	$3.00E^{-2}$
Phvul.002G196800	WRKY	1206	10	$2.50E^{-3}$
Phvul.002G293200	WRKY	1134	8	$1.46E^{-2}$

Phvul.005G181800	WRKY	1474	9	$2.72E^{-2}$
Phvul.006G111700	WRKY	938	8	$4.48E^{-3}$
Phvul.006G123000	WRKY	955	8	$5.03E^{-3}$
Phvul.007G075400	WRKY	1017	7	$2.19E^{-2}$
Phvul.007G177900	WRKY	1149	7	$4.08E^{-2}$
Phvul.008G058300	WRKY	1077	8	$1.07E^{-2}$
Phvul.008G251300	WRKY	1090	7	$3.13E^{-2}$
Phvul.009G043100	WRKY	912	7	$1.21E^{-2}$
Phvul.009G080000	WRKY	1515	9	$3.20E^{-2}$

^a: cantidad de promotores que contienen sitios de unión en su secuencia en todo el genoma de *P. vulgaris* (27197 promotores). Como background se tomaron los 1500 pb *upstream* del sitio de inicio de la traducción de todos los genes de *P. vulgaris*.

^b: cantidad de sitios de unión encontrados en los promotores analizados (92).

Tabla 11. Elementos *cis* enriquecidos en los promotores de los genes *Down* regulados en respuesta a las 4 cepas de *R. etli* y los posibles factores de transcripción involucrados en su reconocimiento.

TF	Familia	Background bind ^a	Query bind ^b	P value
Phvul.011G071100	AP2	632	2	$7.86E^{-3}$
Phvul.002G146400	AP2	1000	2	$2.68E^{-2}$
Phvul.008G242400	ARF	696	2	$1.02E^{-2}$
Phvul.003G110100	ARR-B	370	2	$1.75E^{-3}$
Phvul.001G258000	ARR-B	381	2	$1.90E^{-3}$
Phvul.008G122100	B3	1125	2	$3.62E^{-2}$
Phvul.005G079400	BES1	1689	3	$2.25E^{-2}$
Phvul.001G016100	BES1	2048	3	$4.19E^{-2}$
Phvul.002G123700	BES1	2079	3	$4.39E^{-2}$
Phvul.010G024800	bHLH	1863	4	$6.05E^{-3}$
Phvul.006G195500	bHLH	1177	3	$6.57E^{-3}$
Phvul.003G037600	bHLH	2416	4	$1.77E^{-2}$
Phvul.007G257100	bHLH	1644	3	$2.06E^{-2}$
Phvul.003G285700	bHLH	1042	2	$2.98E^{-2}$
Phvul.007G179100	bHLH	1042	2	$2.98E^{-2}$
Phvul.010G114800	bHLH	1042	2	$2.98E^{-2}$

Phvul.001G031300	bHLH	2930	4	3.74E^{-2}
Phvul.011G057400	bHLH	1977	3	3.74E^{-2}
Phvul.001G168700	bHLH	2966	4	3.92E^{-2}
Phvul.003G181900	bHLH	2117	3	4.64E^{-2}
Phvul.003G072000	bHLH	3161	4	4.96E^{-2}
Phvul.006G029200	bZIP	1672	4	3.81E^{-3}
Phvul.011G203400	bZIP	600	2	6.81E^{-3}
Phvul.005G153900	bZIP	707	2	1.07E^{-2}
Phvul.005G124100	bZIP	759	2	1.29E^{-2}
Phvul.001G140100	bZIP	972	2	2.49E^{-2}
Phvul.008G247800	bZIP	990	2	2.61E^{-2}
Phvul.001G249300	bZIP	1040	2	2.96E^{-2}
Phvul.004G084300	C2H2	2058	4	9.19E^{-3}
Phvul.003G111900	CAMTA	2147	4	1.09E^{-2}
Phvul.002G209300	CAMTA	1032	2	2.90E^{-2}
Phvul.009G016300	E2F/DP	1100	2	3.42E^{-2}
Phvul.006G011300	EIL	776	2	1.37E^{-2}
Phvul.009G029600	ERF	2118	8	2.63E^{-6}
Phvul.008G222400	ERF	2338	8	5.99E^{-6}
Phvul.007G127800	ERF	3160	8	6.93E^{-5}
Phvul.002G295700	ERF	1818	5	8.16E^{-4}
Phvul.001G111800	ERF	2573	6	8.36E^{-4}
Phvul.009G225000	ERF	2584	6	8.58E^{-4}
Phvul.009G262200	ERF	3080	6	2.43E^{-3}
Phvul.011G162900	ERF	2262	5	2.54E^{-3}
Phvul.008G165000	ERF	4045	7	2.56E^{-3}
Phvul.009G251600	ERF	1591	4	3.07E^{-3}
Phvul.004G068900	ERF	4417	7	4.52E^{-3}
Phvul.007G027000	ERF	3616	6	6.08E^{-3}
Phvul.005G180600	ERF	4813	7	7.75E^{-3}
Phvul.009G089300	ERF	4813	7	7.75E^{-3}
Phvul.010G159500	ERF	4813	7	7.75E^{-3}
Phvul.002G016700	ERF	3804	6	8.05E^{-3}
Phvul.006G183200	ERF	1289	3	9.02E^{-3}

Phvul.002G267800	ERF	3062	5	$1.14E^{-2}$
Phvul.006G047800	ERF	3088	5	$1.18E^{-2}$
Phvul.010G114900	ERF	2235	4	$1.29E^{-2}$
Phvul.002G153900	ERF	1486	3	$1.47E^{-2}$
Phvul.008G220400	ERF	6757	8	$1.86E^{-2}$
Phvul.009G137000	ERF	5576	7	$1.88E^{-2}$
Phvul.003G292400	ERF	1709	3	$2.34E^{-2}$
Phvul.003G212800	ERF	1725	3	$2.41E^{-2}$
Phvul.002G035900	ERF	5821	7	$2.41E^{-2}$
Phvul.001G023700	ERF	2639	4	$2.50E^{-2}$
Phvul.002G056800	ERF	2958	4	$3.88E^{-2}$
Phvul.007G255100	ERF	4028	5	$3.96E^{-2}$
Phvul.010G054000	ERF	2084	3	$4.42E^{-2}$
Phvul.002G055800	ERF	4216	5	$4.82E^{-2}$
Phvul.005G011700	FAR1	1872	3	$3.15E^{-2}$
Phvul.002G021400	G2-like	622	4	$4.12E^{-5}$
Phvul.011G062100	G2-like	585	3	$5.10E^{-4}$
Phvul.002G027200	HD-ZIP	779	2	$1.39E^{-2}$
Phvul.003G251800	HD-ZIP	779	2	$1.39E^{-2}$
Phvul.007G224800	HD-ZIP	792	2	$1.45E^{-2}$
Phvul.011G197300	LBD	3895	9	$5.19E^{-5}$
Phvul.011G116500	LBD	1270	5	$1.17E^{-4}$
Phvul.008G075900	LBD	1954	6	$1.53E^{-4}$
Phvul.001G159300	LBD	1237	4	$1.01E^{-3}$
Phvul.003G203600	LBD	4733	8	$1.55E^{-3}$
Phvul.008G183700	MIKC_MADS	1210	2	$4.35E^{-2}$
Phvul.001G068200	MIKC_MADS	3076	4	$4.49E^{-2}$
Phvul.004G090900	MYB	961	3	$3.19E^{-3}$
Phvul.005G047400	MYB	3276	6	$3.47E^{-3}$
Phvul.009G075000	MYB	3577	6	$5.72E^{-3}$
Phvul.002G088900	MYB	2137	3	$4.78E^{-2}$
Phvul.006G023100	NAC	1200	4	$8.78E^{-4}$
Phvul.008G194600	NAC	1200	4	$8.78E^{-4}$
Phvul.005G059000	NAC	1098	3	$5.14E^{-3}$

Phvul.003G217600	NAC	808	2	$1.53E^{-2}$
Phvul.007G089600	NAC	1114	2	$3.53E^{-2}$
Phvul.L010000	NAC	1189	2	$4.16E^{-2}$
Phvul.005G084500	NAC	1204	2	$4.30E^{-2}$
Phvul.009G011200	Nin-like	3031	5	$1.08E^{-2}$
Phvul.003G008800	SBP	393	3	$1.12E^{-4}$
Phvul.005G101900	SBP	399	3	$1.19E^{-4}$
Phvul.006G183900	SBP	229	2	$4.38E^{-4}$
Phvul.007G210600	SBP	309	2	$1.04E^{-3}$
Phvul.001G089100	TCP	2927	8	$3.75E^{-5}$
Phvul.007G065900	TCP	2885	7	$2.61E^{-4}$
Phvul.011G156900	TCP	2266	5	$2.56E^{-3}$
Phvul.011G120300	TCP	2274	5	$2.61E^{-3}$
Phvul.010G089100	TCP	2342	5	$3.03E^{-3}$
Phvul.004G072100	TCP	4209	7	$3.32E^{-3}$
Phvul.007G015000	TCP	2616	5	$5.28E^{-3}$
Phvul.006G166600	TCP	1878	4	$6.26E^{-3}$
Phvul.003G190900	TCP	2849	5	$8.02E^{-3}$
Phvul.009G202200	TCP	1542	3	$1.66E^{-2}$
Phvul.007G186700	Trihelix	326	2	$1.22E^{-3}$
Phvul.002G109400	WOX	1345	5	$1.61E^{-4}$
Phvul.006G147800	WRKY	1123	2	$3.61E^{-2}$

^a: cantidad de promotores que contienen sitios de unión en su secuencia en todo el genoma de *P. vulgaris* (27197 promotores). Como background se tomaron los 1500 pb *upstream* del sitio de inicio de la traducción de todos los genes de *P. vulgaris*.

^b: cantidad de sitios de unión encontrados en los promotores analizados (18).

3. Análisis de las características de los mRNAs de *P. vulgaris* expresados diferencialmente en respuesta a distintas cepas de *R. etli*

La acumulación diferencial de mRNAs en diferentes condiciones puede deberse en cambios que afectan la síntesis o la degradación. En el primer caso se trata de una regulación transcripcional mediada por elementos presentes en el DNA de los promotores, mientras que la estabilidad de los mRNAs corresponde al nivel de

regulación post transcripcional y está mediada por elementos presentes en el RNA. En base a esto procedimos al análisis de las características y secuencias de los RNAs de cada uno de los grupos que definimos en la sección anterior (*Cepas Alfa*, *4 cepas* y *Total*). A partir de los transcriptos de la variedad mesoamericana se obtuvieron las secuencias de los 5'- y 3'- UTR, y de las regiones codificantes (CDS) de los genes diferenciales (Anexo III, Tabla C). A partir de estas secuencias se determinaron la longitud, el contenido GC, y la energía libre de *Gibbs* (ΔG°), como aquellos parámetros que podrían influir en la estabilidad de los mRNAs (**Figs. 34, 35, 36**).

El análisis de la longitud de los mRNA de los genes expresados *Up* regulados no arrojó diferencias en la longitud de su extremo 5'- UTR (403 nts, grupo *4 cepas*; 439 nts grupo *Cepas Alfa*) ni de su CDS (1222 nts, grupo *4 cepas*; 1273 nts grupo *Cepas Alfa*), con respecto a la media obtenida del total de los mRNAs (media del 5'- UTR, 459 nts; media del CDS, 1331 nts). Sin embargo, estos transcriptos *Up* regulados presentaron una longitud mayor de sus extremos 3'- UTR, tanto para aquellos que responden a cepas de *R. etli* de tipo - α (589 nts) como de las 4 cepas (391 nts) en comparación con la longitud media de los 3'- UTR del total de los mRNA (431 nts (**Fig. 34**)).

Los genes *Down* regulados, tanto del grupo *4 cepas* como del grupo *Cepas Alfa*, presentaron mRNA de menor longitud con respecto a la media de los mRNA totales, tanto de sus extremos no traducidos, como de sus CDS. Esta misma observación se había descrito sobre los genes con ET diferencial, tanto *Up* como *Down* regulados en *M. truncatula* en el capítulo anterior (**Fig. 24**).

Figura 34. Análisis de la longitud de la secuencia codificante (CDS) y de los extremos no codificantes 5'-UTR y 3'-UTR, de los genes UP o Down regulados en *P. vulgaris* en presencia o ausencia de diferentes cepas de rizobios. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un análisis ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). El grupo "Todos" contiene las secuencias de todos los genes de *P. vulgaris*, mientras que el grupo "4 cepas" contiene los genes diferenciales encontrados en plantas inoculadas con todas las cepas de rizobios utilizada: dos cepas tipo $-\delta$ (55N1, 124N1), y dos cepas tipo $-\alpha$ (SC15, CE3). El grupo "Cepas Alfa" contiene los genes que se encontraron regulados diferencialmente sólo en presencia de las cepas tipo $-\alpha$. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticas significativas entre sus medias.

La comparación del contenido GC de los 5'-UTR de los genes *Up* regulados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (**Fig. 35**). Los genes *Up* regulados por las 4 cepas de rizobios presentaron un contenido GC mayor a la media del total de mRNA (0,36 y 0,34 respectivamente). Por su parte, aquellos genes *Up* regulados sólo por las cepas tipo - α , presentan un contenido GC menor a la media de todos los mRNA (0,33). Las regiones codificantes no presentan diferencias significativas y los genes *Up* regulados por las 4 cepas presentan en sus 3' UTR un contenido GC mayor a la media del total de los mRNA (0,37 y 0,36, respectivamente).

Contrariamente a lo observado en el contenido GC de los extremos 5'-UTR de los genes *Up* regulados, los genes *Down* regulados por las 4 cepas presentan el menor contenido de GC (0,31), mientras que los genes *Down* regulados sólo por cepas tipo - α , tienen un contenido mayor que la media del total de mRNA (0,35 y 0,34, respectivamente), (**Fig. 35**). En general, se observa que el contenido GC de los extremos no codificantes de los genes *Down* regulados es menor al contenido GC de los *Up* regulados. Lo contrario sucede con las secuencias codificantes, donde las CDS de los genes *Down* regulados presentan mayor proporción GC, principalmente aquellos genes regulados por las 4 cepas (0,48).

Figura 35. Análisis del porcentaje de bases GC de la secuencia codificante (CDS) y de los extremos no codificantes 5'- UTR y 3'- UTR de los genes *Up* o *Down* regulados en *P. vulgaris* en presencia o ausencia de diferentes cepas de rizobios. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y el 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un análisis ANOVA de una vía y un Test de Tukey de comparaciones múltiples ($\alpha=0,05$). El grupo “Todos” contiene las secuencias de todos los genes de *P. vulgaris*, mientras que el grupo “4 cepas” contiene los genes diferenciales encontrados en plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de rizobios utilizada: dos cepas tipo δ (55N1, 124N1), y dos cepas tipo α (SC15, CE3). El grupo “Cepas Alfa” contiene los genes que se encontraron regulados diferencialmente sólo en presencia de las cepas tipo α . Las letras a, b y c indican diferencias estadísticas significativas entre sus medias.

Para analizar si los mRNA de cada grupo presentan características estructurales diferentes entre sí, calculamos el ΔG° de los extremos no traducidos como parámetro de estabilidad y capacidad de los mRNA de generar estructuras tridimensionales. Los genes que fueron *Up* regulados en presencia de cepas de rizobios tipo α presentan el

ΔG° más bajo, tanto en su extremo 5'-UTR (-124 Kcal/ mol), como en el 3'-UTR (-189 Kcal/ mol). Estas estructuras más estables en ambos extremos podrían estar relacionadas con la mayor estabilidad de los mRNAs en las etapas tempranas de la simbiosis.

Por su parte, los mRNA de los genes *Down* regulados en presencia de cepas tipo $-\alpha$, presentaron extremos 5'- y 3'-UTR con un ΔG° más alto (-61 Kcal/ mol y -37 Kcal/ mol, respectivamente) que la media del total de los mRNA (-100 Kcal/ mol y -96 Kcal/ mol).

Figura 36. Análisis de la energía libre de Gibbs (ΔG°) de los extremos no codificantes 5'-UTR y 3'-UTR de los genes *UP* o *Down* regulados en *P. vulgaris* en presencia o ausencia de diferentes cepas de rizobios. En los *boxplots* se muestran la mediana y los percentiles 25 (extremo inferior de la caja), y 75 (extremo superior de la caja). Las muescas marcan los valores máximo y mínimo en cada grupo. Los análisis estadísticos se realizaron sobre las medias de los grupos, a través de un análisis ANOVA de una vía y un Test de Tukey de comparaciones múltiples ($\alpha=0,05$). El grupo "Todos" contiene las secuencias de todos los genes de *P. vulgaris*, mientras que el grupo "4 cepas" contiene los genes diferenciales encontrados en plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de rizobios utilizada: dos cepas tipo $-\delta$ (55N1, 124N1), y dos cepas tipo $-\alpha$ (SC15, CE3). El grupo "Cepas Alfa" contiene los genes que se encontraron regulados diferencialmente sólo en presencia de las cepas tipo $-\alpha$. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticas significativas entre sus medias.

4. Búsqueda de secuencias consenso en los extremos 5'-UTR y 3'-UTR de los mRNAs de genes de *P. vulgaris* regulados diferencialmente

Para profundizar en la caracterización de las secuencias de los extremos no traducidos de los genes regulados diferencialmente se analizó la posible presencia de motivos específicos en los 5'- y 3'-UTR de aquellos genes que se regulan de forma conjunta. Se usó la herramienta informática MEME (Bailey et al., 2006) para identificar secuencias en un rango de longitud entre 8 y 25 nts, con un valor de probabilidad menor a $E < 1.10^{-3}$ dentro de los 5'- y 3'-UTR de los genes *Up* y *Down* de los grupos 4 *Cepas* y *Cepas Alfa*.

A partir de este análisis se identificó una secuencia conservada en los 5'-UTR de los mRNAs *Up* regulados de los genes del grupo 4 *Cepas* (**Fig. 37**). Esta secuencia de 25 nts, que denominamos 5-4C (**Fig. 37 A**), es rica en pirimidinas (C y U) y se encuentra en 37 de las 66 secuencias analizadas (56%, $E\text{-value} = 6.10^{-21}$), (Anexo III, Tabla D). Además, este mismo grupo de genes presentó dos motivos conservados en su extremo 3'-UTR. El primero es una secuencia de 25 nts rico en purinas (R), denominada 3-4C-1 ($E\text{-value} = 6,7.10^{-8}$) encontrada en 11 de las 64 secuencias (17%), (**Fig. 37 B, panel superior** Anexo III, Tabla E), y el segundo es una secuencia de 25 nts rico en pirimidinas (Y), principalmente uracilos (U), que denominamos 3-4C-2, encontrada en 37 de las 64 secuencias (74%, $E\text{-value} = 2,2.10^{-5}$), (**Fig. 37 B, panel inferior** Anexo III, Tabla F).

Figura 37. Secuencias consenso presentes en los extremos 5'- UTR o 3'- UTR de genes de *P. vulgaris* regulados diferencialmente en presencia de *R. etli*. Se analizaron las secuencias de los mRNA de los genes que presentaron regulación transcripcional diferencial en presencia de diferentes cepas de *R. etli*. Se realizó un análisis informático con la herramienta web MEME (Bailey et al., 2009) sobre los grupos de mRNA que fueron *Up* o *Down* regulados en presencia de rizobios que contenían tanto el alelo α como el δ del gen *NodC* (grupo 4 *Cepas*). **A.** Secuencia conservada de 25 nts en el extremo 5'- UTR de mRNA *Up* regulados, rico en pirimidinas (Y), (E -value= 6.10^{-21}), denominada 5-4C. **B.** Sobre el extremo 3'- UTR del mismo grupo de mRNA, se encontraron dos secuencias conservadas. El panel superior muestra una secuencia denominada 3-4C-1 de 25 nts rica en purinas (R), (E -value= $6,7.10^{-8}$); mientras que en el panel inferior se muestra una secuencia denominada 3-4C-2, de bases complementarias a la anterior de 25 nts rica en bases pirimidicas (Y), principalmente uracilo (U), (E -value= $2,2.10^{-5}$). Debajo de cada motivo se muestra la secuencia consenso correspondiente.

La presencia de elementos conservados con mayoría de bases adenina y uracilo en los extremos no codificantes, sugiere que los extremos 3'- UTR de los mRNA de genes *Up* regulados del grupo 4 *Cepas* podrían presentar estructuras tridimensionales más estables, que les provean una estabilidad mayor que la media de los transcriptos. De hecho, los valores de ΔG° de los 7 mRNA que presentan ambos motivos ($-163,84$ Kcal/mol en promedio) es mucho menor a la media del grupo (-60 Kcal/mol) (**Tabla 12**). En conjunto, este grupo de genes abarcan diferentes funciones como percepción y

señalización, transporte, metabolismo, regulación transcripcional y nodulación, que son claves para la reorganización celular y metabólica para la biogénesis del nódulo, a partir de la percepción temprana de rizobios simbiotes.

Tabla 12. Valores de energía libre de Gibbs (ΔG°) de los extremos 3'-UTR de 7 mRNAs *Up* regulados en presencia de rizobios, que presentan dos motivos consenso en esa región.

Gen	Posición motivo rico en (R) ^a	Posición motivo rico en (Y) ^b	ΔG° (Kcal/ mol) ^c	Anotación ^d	Función ^d
PHASIBEAM10F015862	774	153	-95,4	calmodulin-binding family protein	Percepción y señalización
PHASIBEAM10F014665	196	299	-185,3	chorismate mutase 2	Metabolismo
PHASIBEAM10F008247	156	380	-200,9	sulfate transporter 3	Transporte
PHASIBEAM10F026367	78	173	-116,3	myb domain protein 45	Regulación transcripcional
PHASIBEAM10F027964	98	162	-261,5	MATE efflux family protein	Transporte
PHASIBEAM10F008919	513	618	-218,7	MATE efflux family protein	Transporte
PHASIBEAM10F010560	101	246	-68,8	early nodulin-like protein 12	Nodulación

^a Posición del motivo rico en R sobre la secuencia del extremo 3'-UTR del gen.

^b Posición del motivo rico en Y sobre la secuencia del extremo 3'-UTR del gen.

^c El valor promedio del ΔG° del grupo de genes *Up* regulados en presencia de rizobios es -60 Kcal/ mol.

^d La anotación y la función fueron obtenidas a partir del genoma de la variedad andina línea G19833 (Schmutz et al., 2014)

El análisis de las secuencias de los mRNA de los genes regulados en presencia sólo de cepas de rizobios tipo α permitió identificar dos motivos conservados (**Fig. 38**). En el extremo 5'-UTR de los mRNA de los genes *Up* regulados, se encontró una secuencia de 14 nts rica en purinas (R) en 23 genes de los 29 analizados (79%, Anexo III, Tabla G), que denominamos *5- α Up* (E -value= $1,9 \cdot 10^{-4}$, **Fig. 38 A**). Este motivo es similar al que se describió en genes con ET positiva en presencia de rizobios (Capítulo II de esta tesis) y en trabajos previos en interacciones patogénicas (Xu et al., 2017), por lo que especulamos que la presencia de estos elementos podría estar asociada a la traducibilidad de los RNAs.

Figura 38. Secuencias consenso presentes en los extremos 5'- UTR o 3'- UTR de genes de *P. vulgaris* regulados diferencialmente sólo en presencia de *R. etli* tipo -α. Se analizaron las secuencias de los mRNA de los genes que fueron *Up* regulados o *Down* regulados sólo en presencia de cepas de *R. etli* que portan el alelo tipo -α del gen *NodC*. **A.** Secuencia consenso encontrada en el extremo 5'- UTR de mRNA *Up* regulados, rica en purinas (R) de 14 nts de extensión que denominamos *5-αUp*. **B.** Secuencia de 25 nts conservada en el extremo 3'- UTR de genes *Down* regulados que denominamos *3-αDown*. Debajo de cada motivo se muestra la secuencia consenso correspondiente.

El segundo elemento, al que denominamos *3-αDown* (**Fig. 38 B**, Anexo III, Tabla H), se identificó a partir de los extremos 3'- UTR de los genes *Down* regulados. Tiene una longitud de 25 nts y se encontró en 8 de los 13 genes que componen este grupo (61%, $E\text{-value} = 1,9 \cdot 10^{-7}$).

Para corroborar que las secuencias identificadas presentan un enriquecimiento específico en los grupos donde fueron encontradas, analizamos su presencia en las secuencias de los grupos restantes. Se utilizó el algoritmo **FIMO** (*Find Individual Motif Occurrences*), (Grant et al., 2011) para buscar un motivo específico en un grupo de secuencias. En todos los casos, los valores estadísticos fueron de al menos dos órdenes de magnitud menores a los $E\text{-values}$ de estos mismos motivos evaluados sobre los mRNA de los otros grupos de genes (**Tabla 13**). Estos resultados muestran que, en todos los casos, el nivel de enriquecimiento y los valores de probabilidad ($E\text{ value}$) asociados a las secuencias identificadas por el algoritmo MEME fueron mejores en los grupos donde

fueron encontrados originalmente, sugiriendo que estos motivos podrían tener un rol en el reconocimiento y regulación de los procesos que afectan a los mRNA de los genes que los contienen.

Tabla 13. Análisis FIMO para la búsqueda de motivos conservados en otros grupos de genes regulados diferencialmente.

Motivo	Grupo de genes	<i>E- value</i> ^b	<i>E- value</i> en
	encontrado ^a		otros grupos ^c
5- 4C	4 cepas Up	3,32e ⁻¹¹ - 9,41e ⁻⁵	1.05e ⁻⁵ - 7.56e ⁻⁵
3- 4C- 1	4 cepas Up	3,47e ⁻¹² - 4,8e ⁻⁸	1.37e ⁻⁵ - 9.22e ⁻⁵
3- 4C- 2	4 cepas Up	2,07e ⁻¹⁰ - 1,06e ⁻⁴	1.3e ⁻⁵ - 9.8e ⁻⁵
5- α Up	Cepas Alfa Up	6,89e ⁻¹² - 1,62e ⁻⁸	2.25e ⁻⁵ - 9.76e ⁻⁵
3- α Down	Cepas Alfa Down	2,13e ⁻¹³ - 1,16e ⁻⁸	2.17e ⁻⁵ - 9.33e ⁻⁶

^a: grupo de genes diferencialmente regulados donde fue encontrado originalmente el motivo analizado.

^b: rango de valores del estadístico del grupo donde fue encontrado el motivo, que describe la probabilidad de encontrar esa secuencia de forma aleatoria. Datos obtenidos por la herramienta MEME (Bailey et al., 2009).

^c: rango de valores del estadístico dentro de los otros tres grupos de genes regulados diferencialmente, donde no fue encontrado originalmente el motivo analizado. Valores obtenidos a través de la herramienta FIMO (Grant et al., 2011).

5. Búsqueda de motivos regulatorios en los extremos UTR de los mRNA de genes regulados diferencialmente

Como mencionamos en el capítulo anterior, existen sitios de reconocimiento para RBPs o sRNAs sobre las secuencias no codificantes de los mRNA, que influyen sobre la regulación de su traducción y/o estabilidad. El siguiente paso entonces fue analizar si los mRNA de los genes corregulados en presencia de 4 *Cepas*, o *Cepas Alfa*, presentaban alguna característica compartida en las secuencias de sus transcriptos que pueda influir en su regulación post-transcripcional. La búsqueda se realizó sobre los extremos UTR de las secuencias utilizando la herramienta web *ITB Tools* (Grillo et al., 2009), tal como fue utilizada en el capítulo II para los genes implicados en la vía del Factor *Nod*.

Una característica común encontrada en los 5'- UTR de los 4 grupos de mRNA analizados es el alto porcentaje de mensajeros que presentan secuencias uORF (entre 50% - 79%, **tabla 14**). Dentro de los 4 genes del grupo 4 *Cepas Down* regulados que presentan uORFs, dos de ellos también contienen un sitio IRES (*PHASIBEAM10F022756*,

PHASIBEAM10F025178), para el posicionamiento alternativo del ribosoma (posiciones 268 y 306, respectivamente).

Tabla 14. Presencia de motivos regulatorios sobre las secuencias UTR de genes regulados diferencialmente en su transcripción en presencia de rizobios.

Grupo de genes	Gen	Longitud 5'- UTR (nts)	Posición en 5'- UTR ^a		Longitud 3'- UTR (nts)	Posición en 3'- UTR ^b	
			uORF	IRES		PAS	CPE
4 Cepas Up	PHASIBEAM10F002851	239	41				
	PHASIBEAM10F003339				291	253	
	PHASIBEAM10F003660	218	20				
	PHASIBEAM10F004499	650	110, 272, 569				
	PHASIBEAM10F004944				176	137	
	PHASIBEAM10F004946	278	19, 87				
	PHASIBEAM10F005403	308	32, 149		308	277	
	PHASIBEAM10F006001	388	20, 121		192	171	
	PHASIBEAM10F008540	287	19				
	PHASIBEAM10F009592	222	11				
	PHASIBEAM10F010193	140	20				
	PHASIBEAM10F010598	173	23				
	PHASIBEAM10F012020	397	6, 215				
	PHASIBEAM10F013517				194	156	
	PHASIBEAM10F013856	502	60	418			
	PHASIBEAM10F014198	197	64	104			
	PHASIBEAM10F014476	303	60		220	199	
	PHASIBEAM10F014665				367	336	
	PHASIBEAM10F015299	190	44				
	PHASIBEAM10F015310	785	16, 123, 203, 307, 529, 661				
	PHASIBEAM10F015776	547	17, 104, 310, 448		223	187	
	PHASIBEAM10F015862				991	985	
	PHASIBEAM10F016633				274	236	
	PHASIBEAM10F016635				285	269	
	PHASIBEAM10F017067	167	6				
	PHASIBEAM10F017072	161	7	78			
	PHASIBEAM10F017485	255	40				
	PHASIBEAM10F019351	213	11				
	PHASIBEAM10F019878	124		51			
	PHASIBEAM10F020806				222	215	
	PHASIBEAM10F022209	460	27, 199, 322	363			
	PHASIBEAM10F022482	291	2	194			
	PHASIBEAM10F025913	245	21		241	209	
	PHASIBEAM10F026953	211	116	116			
	PHASIBEAM10F027133	184	29				
	PHASIBEAM10F027216				134	98	
	PHASIBEAM10F027923	271	80				
	PHASIBEAM10F027964	142	6				
	PHASIBEAM10F006160				369	362	345
4 Cepas Down	PHASIBEAM10F004372				45	33	
	PHASIBEAM10F024660	268	3, 138				
	PHASIBEAM10F022756	373	6, 98	268			
	PHASIBEAM10F009253	348	67, 188				
	PHASIBEAM10F025178	396	15, 193	306			

(Tabla 14, continuación)

Grupo de genes	Gen	Longitud 5'- UTR (nts)	Posición en 5'- UTR ^a		Longitud 3'- UTR (nts)	Posición en 3'- UTR ^b	
			uORF	IRES		PAS	CPE
Alfas Up	PHASIBEAM10F000984	245	45				
	PHASIBEAM10F001015				239	233	
	PHASIBEAM10F001526				539	530	
	PHASIBEAM10F001526	338	10				
	PHASIBEAM10F002566	148	54				
	PHASIBEAM10F003977	134	26				
	PHASIBEAM10F004585	853	37, 271, 666		247	233	
	PHASIBEAM10F005485	578	14, 96, 222, 338	483			
	PHASIBEAM10F005684	427	1, 235, 343				
	PHASIBEAM10F006475	377	62, 178				
	PHASIBEAM10F008053	533	98, 282		274	245	
	PHASIBEAM10F008529	206	83				
	PHASIBEAM10F010363				711	702	
	PHASIBEAM10F011596	558	41, 196				
	PHASIBEAM10F013078	576	6, 129, 228, 351				
	PHASIBEAM10F013832	357	16, 182, 252				
	PHASIBEAM10F014192	501	28, 384				
	PHASIBEAM10F014465	852	1, 81, 227, 338	746			
	PHASIBEAM10F015092	236	28				
	PHASIBEAM10F015970				2063	2054	
	PHASIBEAM10F016386	600	1, 184, 352, 506		295	288	
	PHASIBEAM10F018939	468	6, 105		134	129	
	PHASIBEAM10F019353	610	37, 270		441	416	
	PHASIBEAM10F020718	521	150, 346	420	110	78	
	PHASIBEAM10F021687	813	23, 314	724			
	PHASIBEAM10F025749				351	319	
	PHASIBEAM10F019804				491	482	
Alfas Down	PHASIBEAM10F006160	292	133	200	257	239	
	PHASIBEAM10F014664	143	16				
	PHASIBEAM10F015208	294	22, 162				
	PHASIBEAM10F023551	502	76		134	122	
	PHASIBEAM10F023582	122	56		688	667	
	PHASIBEAM10F024229	257	15				
	PHASIBEAM10F026125	185	5				
	PHASIBEAM10F026126	223	42		617	610	
	PHASIBEAM10F027841	265	5				

^a: la posición +1 se considera el extremo 5' de la secuencia del extremo 5'- UTR.

^b: la posición +1 se considera el extremo 5' de la secuencia 3'- UTR, inmediatamente después del codón STOP del mORF.

Para los genes del grupo 4 *Cepas Up* regulados, esta combinación de motivos lo presentan 7 genes, dentro de los cuales se encuentran los factores de transcripción *PHASIBEAM10F026953* (de la familia AP2/ ERF), *PHASIBEAM10F019878* (superfamilia de factores de transcripción WRKY), y *PHASIBEAM10F022209*, que es el factor de transcripción PvNF-YA1, involucrado en la organogénesis del nódulo (Rípodas et al., 2015; Rípodas et al., 2019). Como se describió en el capítulo anterior, el mRNA de *NF-YA1* de *M. truncatula* también contiene un motivo IRES en su extremo 5'. Otro de los mRNAs que contienen uORFs y secuencias IRES es *PHASIBEAM10F013856*, que codifica para una citoquinina oxidasa. Finalmente, 23 genes de 29 transcriptos del grupo *Cepas Alfa Up* regulados presentan uORF, de los cuales 4 también presentan motivos IRES.

DISCUSIÓN CAPÍTULO III

En este capítulo, hemos caracterizado los elementos regulatorios presentes en los promotores y los mRNA de los genes de *P. vulgaris* que presentaron un cambio significativo en sus niveles transcripcionales, cuando las plantas fueron inoculadas con diferentes cepas de *R. etli*. La respuesta transcripcional asociada a la respuesta general a la nodulación involucra aquellos genes que responden a las diferentes cepas de *R. etli* usadas en el estudio transcriptómico. En contraposición, los RNAs que se acumulan diferencialmente en respuesta a las dos cepas de tipo α representan aquellos genes involucrados en el reconocimiento específico de cepas más eficientes. El análisis de los elementos de respuesta presentes en los promotores de ambos grupos difiere entre sí, indicando que la red regulatoria que opera en cada uno de los casos involucra factores de transcripción diferentes. Los promotores de los genes *Up* regulados contienen elementos *cis* correspondientes a pocos factores de transcripción presentes en muchos promotores, mientras que los genes *Down* regulados muestran una mayor diversidad y dispersión en su respuesta, tanto en el grupo de los genes comunes como los específicos de cepas eficientes. Esta caracterización inicial de estos elementos constituye un punto de partida para comprender las redes regulatorias que controlan la respuesta a rizobios a nivel transcripcional. En el caso particular de la respuesta asociada a la selección de cepas, esta información puede contribuir a comprender cómo el proceso de domesticación ha actuado sobre los mecanismos naturales de *partner selection* (capacidad de las plantas para identificar y seleccionar a los mejores socios en un escenario de muchos potenciales socios, mucho antes de que se formen nódulos, y que las bacterias comiencen a fijar el nitrógeno), y *partner choice* (teoría que sugiere la conservación de relaciones simbiotes, por sobre la aparición de relaciones no benéficas) en las diferentes especies (Simms and Lee Taylor, 2002; Akçay, 2015; Clúa et al., 2018).

El análisis de ciertos parámetros de los transcriptos mostró algunas características distintivas según su regulación transcripcional. Los mRNAs correspondientes a los genes que aumentan sus niveles en respuesta a *Cepas Alfa* contienen extremos con menor

capacidad de formar estructuras secundarias, mientras que los *Down* regulados poseen regiones 5' UTR más cortas y con mayor ΔG° . Los genes *Down* regulados en el grupo que responde a las 4 cepas son más cortos en comparación con el total de los mRNAs, poseen menor porcentaje de GC en sus 5'-UTR y CDS, y 3'-UTR más estructurados y con mayor GC. Estas características podrían estar asociadas a la regulación de la estabilidad de los mRNAs en las etapas tempranas de la simbiosis o con la traducibilidad de estos mRNAs. La aplicación de la técnica de TRAP en el poroto podría contribuir a correlacionar estas características con la ET de los mRNAs, tal como se hizo en el capítulo anterior para el sistema *M. truncatula*-*S. meliloti*. Por otra parte, estudios de degradoma permitirían correlacionar las características de los transcriptos con su regulación durante la simbiosis.

Los motivos consenso identificados en los extremos 5' y 3' no codificantes de los genes regulados en respuesta a rizobios, podrían representar elementos que afectan o bien la estabilidad o la traducibilidad de los transcriptos durante la asociación simbiótica. Dentro de los genes que presentan los motivos consenso 3-4C-1 y 3-4C-2 encontrados en los extremos 3' del grupo 4 cepas *Up* regulados, se identificaron 7 mRNAs que contienen ambos. Es interesante destacar que las secuencias de ambos motivos contienen bases complementarias entre ellas, por lo que creemos podrían explicar en parte la mayor estabilidad de los transcriptos, comparados con la media del grupo. Uno de estos genes, el *PHASIBEAM10F026367*, es un factor de transcripción de tipo *Myb*, usualmente involucrados en el control de la expresión génica durante la morfogénesis y el desarrollo (Ambawat et al., 2013; Katiyar et al., 2012). *PHASIBEAM10F014665*, codifica para la enzima corismato mutasa que cataliza la reacción que genera prefanato, el último eslabón en común de las vías de síntesis de los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. *PHASIBEAM10F008247* es un transportador transmembrana de sulfatos, y los genes *PHASIBEAM10F027964* y *PHASIBEAM10F008919*, pertenecen a la familia **Multi Antimicrobial Extrusion (MATE)**, los cuales funcionan como antitransportadores de sodio/ xenobióticos. Por último, una nodulina temprana, la *ENOD12* (*PHASIBEAM10F010560*), también presenta ambos motivos. En conjunto, este grupo de genes abarcan variadas funciones que son claves

para la reorganización celular y metabólica para la biogénesis del nódulo, a partir de la percepción temprana de rizobios simbiotes.

En el capítulo anterior describimos la presencia de motivos uORF e IRES sobre genes de la vía del NF. Ambos elementos permiten ensamblar los ribosomas e iniciar la traducción en un lugar alternativo al codón de inicio principal (von Arnim et al., 2014; Le and Maizel, 1997). Se encontró un alto porcentaje de uORF en los mRNA en todos los grupos, además de 14 genes que también presentaron al menos un motivo IRES. Tres de ellos fueron genes *Down* regulados, entre ellos el gen *PHASIBEAM10F022756*, que codifica para la subunidad A del complejo F₀ de la ATP-sintasa involucrada en la generación de ATP en membranas mitocondriales o cloroplastos. El gen *PHASIBEAM10F025178* codifica para una glutarredoxina, que funciona como transportadora de electrones en la síntesis de deoxirribonucleótidos por la enzima ribonucleótido reductasa, a través de una vía dependiente de glutatión (Holmgren, 1988, 1989). Así, la presencia de rizobios podría alterar en forma directa la producción de energía y el estado redox de la célula.

Entre los 11 mRNAs que presentaron motivos IRES se encontraron dos genes *Down* regulados implicados en la señalización y remodelación de la pared celular. *PHASIBEAM10F017072*, es un receptor de tipo tirosina quinasa asociado a pared celular, aunque se desconoce su función precisa. Otro de los genes es *PHASIBEAM10F022482*, que codifica para una proteína de la familia *COBRA-like*, implicada en el ensamblaje, la disposición de las partes constituyentes o el desmontaje de microfibrillas de celulosa (Roudier et al., 2002, 2005). El avance del hilo de infección desde la punta del pelo radical hacia el córtex de la raíz requiere la degradación de la pared celular (J.Gage, 2017; Arrighi et al., 2008), por lo que es importante la síntesis de remodeladores de la pared celular para que la colonización del nódulo sea efectiva (Fournier et al., 2008). En conclusión, la presencia de uORFs y secuencias IRES en los mRNAs podrían afectar la regulación traduccional que, como se discutió en el capítulo anterior, puede ser determinante en los niveles de productos génicos (RNAs o proteínas) que determinan la reprogramación de las células durante la simbiosis.

La caracterización de los mRNA que son regulados diferencialmente, puede ser el puntapié inicial en la profundización del entendimiento y relevancia que tienen estas características sobre la regulación y el rearrreglo transcripcional y traduccional que se da sobre la expresión génica de las plantas noduladoras durante su interacción con rizobios fijadores de nitrógeno.

Conclusiones y Perspectivas

Los complejos ribonucleoproteicos (RNP) están compuestos principalmente por moléculas de mRNA traduccionalmente inactivos y por diversas proteínas que regulan la traducción, localización y degradación de los mRNA a los que se unen. Estos RNPs son estructuras dinámicas sin membrana que pueden ensamblarse y desensamblarse dependiendo del contexto celular o en respuesta a señales endógena y exógena. Su importancia en la regulación de la expresión génica es de gran alcance. En los últimos años los RNPs han sido asociados fuertemente en una variedad de enfermedades (especialmente desórdenes degenerativos), por lo que el estudio de esta temática en células humanas está atravesando un momento de gran auge (Buchan, 2014), pero también se ha comenzado a estudiar el rol de SGs y PBs en plantas. Sin embargo, la relación entre su estructura, composición y función sigue siendo incierta (Hubstenberger et al., 2017). De hecho, se especula con la posibilidad de que los mismos RNPs tengan funciones diferentes dependiendo del organismo, la célula, el estado metabólico y las condiciones generales de la célula y el ambiente que la rodea.

Los RNPs citoplasmáticos PBs y SGs son los orgánulos mejor caracterizados. Los mismos han sido caracterizados en detalle en levaduras y humanos. Aunque son estructuras conservadas en eucariotas, la constitución de los mRNA y proteínas que componen los SGs y PBs es muy diversa y depende de múltiples variables, desde el organismo en estudio, del estado celular, hasta incluso el tipo celular específico y su estadio de desarrollo (Standart and Weil, 2018), por lo que la extrapolación de los descubrimientos sobre la función y composición de estos mRNPs en otros organismos, puede llevar a malas interpretaciones sobre la función y composición de estos mRNPs en nuestro sistema de estudio. En plantas, sólo se han descripto hasta el momento datos de expresión obtenidos por microarreglos de DNA de muestras de SGs en *A. thaliana* en condiciones de hipoxia (Sorenson and Bailey- Serres, 2014). En la presente tesis doctoral, uno de los objetivos propuestos fue poner a punto la técnica de purificación de los complejos RNPs que contienen las proteínas DCP1 y RBP47 en una planta leguminosa, para luego caracterizar el movimiento de RNAs entre los diferentes complejos RNP citoplasmáticos que regulan la expresión génica durante la simbiosis en las raíces de *M. truncatula*. DCP1 y RBP47 están fuertemente asociadas a PBs y SGs, respectivamente, es decir que los RNAs asociados que obtuvimos a partir de la inmunoprecipitación de estas proteínas representarían la subpoblación de RNAs citoplasmáticos asociados a

dichos complejos RNP. Así, la caracterización de los mRNAs asociados a PBs podría aportar datos muy novedosos en plantas. En una etapa posterior, que excede el desarrollo de esta Tesis doctoral, se construirán bibliotecas para secuenciación masiva utilizando la tecnología de *Illumina*, tal como fue realizado previamente con las muestras provenientes de TRAP (Traubenik et al, 2019). Contamos con el tejido y el RNA de tres réplicas biológicas de cada construcción para dar el siguiente paso en este sentido. El RNA purificado durante el desarrollo de esta tesis posee la calidad y concentración necesarias para llevar a cabo estos experimentos. En este sentido, los resultados presentados en el Capítulo I constituyen una etapa inicial, pero a la vez necesaria para caracterizar estos complejos, PBs y SGs, aplicando la técnica de RIP.

Los datos de abundancia de mRNAs individuales que codifican proteínas involucradas en la vía de señalización del NF obtenidos mediante RT- qPCR sobre muestras RIP de PBs y SGs, sumados a los descriptos previamente por Reynoso y colaboradores (2013a) para polisomas, permiten proponer una regulación postranscripcional de la vía del NF en *M. truncatula* que depende de la movilización de RNAs entre los polisomas, los SGs y los PBs. Así, hemos ampliado nuestra visión de la dinámica de los mRNAs en el citoplasma y la capacidad que tienen las células de controlar su traducción durante la reprogramación génica asociada a la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Por otra parte, la visualización por microscopia confocal de las fusiones de RBP47 y DCP1 a proteínas fluorescentes también permitió observar la dinámica y colocalización de los mRNPs *in vivo* en tejido foliar de *N. benthamiana* así como también la localización en células de raíces de *M. truncatula*. Las construcciones *35S:RBP47-rfp* y *35S:DCP1-yfp* generadas en esta tesis, podrán utilizarse en el futuro para la co-transformación de raíces y hacer un seguimiento en pelos radicales o en células corticales del movimiento y dinámica de estos gránulos a diferentes tiempos luego de la inoculación de *M. truncatula* con *S. meliloti*. Este desarrollo provee una herramienta valiosa para analizar la regulación post-transcripcional citoplasmática durante procesos biológicos que involucran la raíz de plantas leguminosas, particularmente de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Los mRNAs presentan una serie de características intrínsecas que determinan la eficiencia de su traducción (von Arnim et al., 2014). Estas características incluyen a las regiones 5'- UTR y 3'- UTR, el cap 7-metil guanosina (m7GpppN) en el 5' y la cola de poli

(A). Además, la estructura secundaria adoptada por un mRNA también puede influir en su eficiencia traduccional. Hemos encontrado que, en *M. truncatula*, la longitud de sus mRNAs, el contenido GC, y la estructura secundaria, tanto de sus secuencias no traducidas como de las codificantes, están correlacionadas con la eficiencia traduccional, sugiriendo que estos parámetros influyen en la asociación de los transcriptos a los polisomas en el contexto de la reprogramación génica y la modulación de su traducción durante la simbiosis. Al mismo tiempo, en *P. vulgaris* encontramos relaciones estrechas entre los cambios en los mRNA que se acumulan diferencialmente en presencia de rizobios, y las mismas características descritas anteriormente. Incluso, algunas de estas características están relacionadas con la especificidad y capacidad de la planta de seleccionar cepas de rizobios más eficientes para la nodulación. Además, el análisis de los elementos regulatorios presentes en los mRNAs de los genes que forman parte de la vía del NF mostró que algunos factores de transcripción podrían tener un mecanismo de regulación traduccional adicional al resto de los genes implicados en la vía del NF, por ejemplo, a partir de la presencia del motivo IRES en sus secuencias 5' no traducidas. Por último, la caracterización de los elementos regulatorios presentes en los promotores de los genes de *P. vulgaris* que se expresan diferencialmente en respuesta a diferentes cepas de *R. etli*, reveló diferencias en las redes regulatorias que operan sobre los genes que son *Up* regulados, respecto de los *Down* regulados, tanto en el grupo de los genes comunes como en los específicos de cepas eficientes. Por lo tanto, la caracterización de los elementos regulatorios de los mRNA que son regulados diferencialmente, puede ser el puntapié inicial en la profundización del entendimiento y relevancia que tienen estas características sobre la regulación a nivel transcripcional y traduccional que se da sobre la expresión génica de las plantas noduladoras durante su interacción con rizobios, controlando tanto el establecimiento como la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno, un proceso de alta importancia biológica, ecológica y económica.

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 semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron provistas por la Dra. Carina Reyes (Laboratorio de Virología y Bacteriología Vegetal, IBBM).

1.2 Cepas bacterianas

- ***Escherichia coli* DH5 α** . Utilizada para la transformación de vectores plasmídicos.
- ***E. coli* TOP10** (Invitrogen). Utilizada para la transformación de vectores derivados de pENTRTM/D-TOPO (Invitrogen).
- ***Agrobacterium rhizogenes* ARqua1**. Utilizada para la transformación de raíces de *M. truncatula*. Fue obtenida de la Universidad de Ghent, Bélgica (Quandt 1993).
- ***A. tumefaciens* GV3101**. Utilizada para la transformación de hojas de *N. benthamiana*.
- ***Sinorhizobium meliloti* 1021**. Rizobio utilizado para la inoculación de *M. truncatula* (Meade and Signer, 1977).
- ***E. coli* ccdB survival 2 TR1** (Invitrogen). Utilizada para la transformación de vectores plasmídicos compatibles con el sistema de GATEWAY (Invitrogen).

1.3 Vectores de clonado

- **pENTRTM/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 (Km^r) para su selección en bacterias.
- **p35S: FH**. Utilizado para la expresión de proteínas fusionadas a un epítipo dual FLAG- HIS en su N-terminal (Zanetti *et al.*, 2005). El plásmido posee el gen *Cm^r* que confiere resistencia a cloranfenicol para su selección en bacterias.
- **p35S: GAT-FH**. Versión derivada del vector *p35S: FH* compatible con el sistema GATEWAY (Zanetti *et al.*, 2005).

- **p35S: RBP47-FH.** Versión derivada del vector *p35S: GAT-FH* que contiene el marco abierto de lectura de la proteína RBP47 de *M. truncatula* (Medtr3g101370) para su sobreexpresión.

- **p35S: DCP1-FH.** Versión derivada del vector *p35S: GAT-FH* que contiene el marco abierto de lectura de la proteína DCP1 de *M. truncatula* (Medtr2g086970) para su sobreexpresión.

- **p35S: XRN4-FH.** Versión derivada del vector *p35S: GAT-FH* que contiene el marco abierto de lectura de la proteína XRN4 de *M. truncatula* (Medtr7g114570) para su sobreexpresión.

- **p35S: UBP1-FH.** Versión derivada del vector *p35S: GAT-FH* que contiene el marco abierto de lectura de la proteína UBP1 de *M. truncatula* (Medtr8g022050) para su sobreexpresión.

- **pK7WG2D.** Vector compatible con el sistema GATEWAY para la sobreexpresión de proteínas fusionadas a una proteína fluorescente bajo el promotor CaMV35S (Karimi *et al.*, 2002),. El plásmido posee el gen *Sp^r* que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias.

1.4 Antibióticos

Se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos en medios de cultivo sólidos o líquidos.

Antibiótico	<i>E. coli</i> (µg/ml)	<i>A. tumefaciens</i> (µg/ml)	<i>A. rhizogenes</i> (µg/ml)	<i>R. etli</i> (µg/ml)	<i>S. meliloti</i> (µg/ml)
Cloranfenicol	50	150	150	-	-
Kanamicina	50	50	200	-	-
Tetraciclina	-	-	-	5	-
Rifampicina	-	100	-	-	-
Espectinomicina	-	-	200	-	-
Gentamicina	-	15	-	-	-
Streptomycin	-	-	-	-	200

2. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico

2.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico

La preparación de DNA plasmídico se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook 2001) a partir de células de *E. coli* transformadas. Las células transformadas con los plásmidos correspondientes se cultivaron en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l) conteniendo el antibiótico adecuado. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con agitación (150 rpm) hasta saturación. Para cada minipreparación de DNA plasmídico se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 4.000 xg durante 5 minutos y el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de buffer P1 (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se adicionaron 200 µl de buffer P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v)), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de buffer P3 (Acetato de potasio (KAc) 5M, pH 4,8) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos. Luego de centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se precipitó el DNA con el agregado de 2 volúmenes de etanol. Se centrifugó a 12000 xg por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. A continuación, el precipitado fue lavado con etanol 70 % v/v, se centrifugó y descartó el sobrenadante como en el paso anterior. Por último, se resuspendió el DNA en agua ultrapura.

Las preparaciones de DNA plasmídico para enviar a secuenciar, efectuar digestiones plasmídicas y subclonados fueron obtenidas utilizando el kit comercial Puro/ Plásmido (Productos Bio-Lógicos, Argentina, Cat. SA02).

2.2 Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmídico se realizaron de acuerdo a las condiciones indicadas por los proveedores de cada enzima de restricción en particular. En todos los casos se utilizaron 1 a 5 U de enzima por cada µg de DNA plasmídico a digerir. Las digestiones se llevaron a cabo durante 2-3 horas a 37 °C en un volumen final de 10 µl.

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

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 15 µl. Se utilizaron $5 \cdot 10^{-12}$ moles de cada *primer* por reacción, una mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs,

concentración final 0,25 mM de dCTP, dGTP, dATP y dTTP), MgSO₄ 1,5 mM, *buffer* comercial para *Taq* polimerasa y 0,5 U de enzima (Invitrogen). Como molde se utilizaron células, plásmidos, DNA genómico o cDNA dependiendo del caso. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico *Mastercycler gradient* (Eppendorf). El ciclado incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de un número de ciclos de desnaturalización, *annealling* y elongación, y una etapa final de elongación. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación exceptuando los casos de amplificación semicuantitativa. Cada ciclo consistió de 30 seg a 92 °C. La temperatura de *annealling* se eligió 5 °C por debajo de la temperatura de *melting* de los *primers* utilizados. Cada ciclo se completó con una incubación a 72 °C durante 1 minuto por cada kpb a amplificar. Finalizados los ciclos, se mantuvo a 72 °C durante 5 minutos para la etapa de elongación final.

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

2.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA plasmídico y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango entre 0,8 % y 1,2 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en *buffer* TBE 0,5X (Tris base 0,045 M, H₃BO₃ 0,045 M, EDTA 0.5 mM) y se adicionó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Antes del sembrado se agregó a las muestras 1/6 volumen de *buffer* 6X de siembra para DNA (*buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,5 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5X a voltaje constante de 100 V. Para visualizar y registrar las corridas electroforéticas se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (UV) UVITEC Cambridge con cámara digital. Para la captura de imágenes se utilizó el equipo UVIsave HD5.

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

Los fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el *kit* comercial Puro Gel Extraction (PB-L, Cat. SA01), siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.6 Clonado de fragmentos de PCR en pENTR/D-TOPO

El vector *pENTR/D-TOPO* permite la incorporación direccional de fragmentos de PCR en un plásmido compatible con el sistema GATEWAY. Se realizó una amplificación con *primers* para la secuencia de interés que contienen los nucleótidos CACC adicionales al 5' del *primer forward*. La reacción con *pENTR/D-TOPO* mediada por la topoisomerasa permite la incorporación del producto de PCR entre las secuencias *attl1* y *attl2* siguiendo el protocolo detallado por el fabricante (Invitrogen). Brevemente, se mezcló 1-5 ng del fragmento amplificado con 0.5 µl del vector *pENTR/D-TOPO* y 0.5 µl de solución salina. Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se plaquearon en medio LB-agar conteniendo kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas.

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

Se realizó una recombinación sitio específica entre el vector *pENTR/D-TOPO* con la construcción adecuada y el vector de destino. El vector de destino contiene las secuencias *attR1* y *attR2* para permitir la recombinación con las secuencias *attl1* y *attl2* del *pENTR/D-TOPO*. Se mezcló 1 µl vector *pENTR/D-TOPO* (100 ng/µl) conteniendo el fragmento de interés con 1 µl del vector de destino (100 ng/µl), 1 µl de la enzima LR clonasa y 2 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) siguiendo los pasos indicados en el manual (Invitrogen). Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche (condición recomendada cuando el tamaño de los plásmidos de destino es mayor a 10 kpb). Luego de este paso se adicionó 1 µl de proteinasa K para inactivar la enzima y se incubó 10 minutos a 37 °C. Con la mezcla de reacción obtenida se transformaron células de *E. coli* DH5Aα competentes. Posteriormente, las transformantes se seleccionaron en medio LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en el vector de destino.

2.8 Preparación de células de *E. coli* DH5 α competentes

Las células de *E. coli* DH5 α se cultivaron en medio LB durante una noche a 37 °C con agitación (150 rpm). Se utilizaron 500 μ l del cultivo saturado para inocular 50 ml de LB, incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,5. Se centrifugó 2 minutos a 2.600 xg y luego se resuspendió en 12,5 ml de la solución de transformación 1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Se repitió la centrifugación, resuspendiendo luego en 12,5 ml de solución de transformación 2 (MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6,5). Luego de 15 minutos de incubación en hielo, se centrifugó nuevamente, resuspendiendo en 2,5 ml de solución de transformación 2. Alícuotas de 150 μ l se fraccionaron en tubos eppendorf y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

2.9 Transformación de células DH5 α competentes

Una suspensión de las células competentes (150 μ l) se mezcló con 2 μ l de plásmido (50 ng/ μ l) y se incubó en hielo por 30 minutos. Se realizó luego un tratamiento térmico (*heat shock*) incubando la muestra a 42 °C durante 45 seg, y se enfrió en hielo por 2 minutos. Seguidamente se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) durante una hora. La mezcla de la transformación se plaqueó en medio LB-agar con el antibiótico adecuado y las placas se incubaron a 37 °C durante 18- 24 horas.

3. Construcción de plásmidos para expresar RBP47, UBP1, DCP1 y XRN4 de *M. truncatula*

3.1 Obtención de construcciones de sobreexpresión mediante el clonado en el vector p35S:FH

Se diseñaron *primers* para amplificar el marco abierto de lectura (ORF) de las proteínas RBP47, UBP1, DCP1 y XRN4 a partir de las secuencias disponibles en el genoma de *M. truncatula* (genes Medtr3g101370, Medtr8g022050, Medtr2g086970 y Medtr7g114570, respectivamente). Se realizó una amplificación por PCR sobre cDNA de tejido de raíz de *M. truncatula* Jemalong A17 (sintetizado tal como se detalla en la

sección 9.2). Los fragmentos de DNA obtenidos se purificaron y fueron introducidos inicialmente en el vector de clonado *pENTR/D-TOPO* siguiendo indicaciones del fabricante. Posteriormente, se recombinó en el vector de expresión p35S:FH (Zanetti et al, 2005) a través de una reacción LR clonasa sitio específica, según especificaciones del proveedor. Los productos de ambas ligaciones se utilizaron para la transformación de las bacterias de *E. coli* DH5A α competentes. La fusión en fase del ORF de RBP47 o DCP1 al plásmido de clonado se confirmó por secuenciación, empleando los *primers* **M13f** y **M13r** (Sección 11), que flanquean el sitio de recombinación. La orientación del ORF de RBP47 o DCP1 al epítipo FH se determinó por reacciones de restricción, utilizando una combinación de enzimas de restricción conveniente. Las construcciones obtenidas fueron dos, y se denominaron p35S:RBP47-FH (proteína RBP47) y p35S:DCP1-FH (proteína DCP1), y las regiones secuenciadas se presentan en el Anexo I.

3.2 Obtención de construcciones para la visualización de gránulos citoplasmáticos por microscopía confocal

Se generaron dos construcciones para la visualización de los gránulos citoplasmáticos *in vivo* en células vegetales. Se utilizaron los ORFs de las proteínas RBP47 y DCP1 clonados en el vector *pENTR/D-TOPO* (Sección 3.2.1), los cuales fueron recombinados en el vector de sobreexpresión **pK7WG2D**, cuyas variantes permiten la expresión como fusión a distintas proteínas fluorescentes. La recombinación sitio específica se efectuó por acción de la LR clonasa según se describió en la sección anterior. De esta manera, se obtuvo la construcción 35S:RBP47-rfp, que permite la sobreexpresión de la proteína RBP47 unida en su extremo carboxilo terminal (Ct) a la proteína fluorescente roja (RFP), y la construcción 35S:DCP1-yfp para sobreexpresar la proteína DCP1 unida en su extremo Ct a la proteína fluorescente amarilla (YFP) (**Fig. 18**). La fusión en fase del ORF de RBP47 o DCP1 a la proteína fluorescente se confirmó por secuenciación, empleando los *primers* **ML 2017 pK7R Fw_764**, y **ML RBP45f-ATG** para la construcción 35S:RBP47-rfp, y los *primers* **pK7YWG2** y **ML DCP1f-ATG** para la construcción 35S:DCP1-yfp (Sección 11). Las regiones secuenciadas se presentan en el Anexo I.

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

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

Las células de *A. rhizogenes* ARqua1 se cultivaron en medio LB durante una noche a 30 °C con agitación (150 rpm). Este cultivo saturado se utilizó para inocular 50 ml de LB, incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. El cultivo bacteriano se enfrió en hielo durante 15-30 minutos y se centrifugó a 6.000 xg durante 10 minutos. Una vez removido el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 ml de glicerol 10 % (v/v). Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, descartando luego el sobrenadante y resuspendiendo en 25 ml de glicerol 10 % (v/v). El mismo procedimiento se repitió reduciendo el volumen de 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 %. Finalmente se fraccionó en alícuotas de 40 µl, se colocaron los tubos rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

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

Se utilizaron cubetas de electroporación de un espesor de 2 mm mantenidas a -20 °C. Cien ng de plásmido se mezclaron con 40 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 BioRad Gene Pulser. Inmediatamente se agregó 1 ml de LB. La mezcla se transfirió a un tubo de cultivo estéril de 15 ml y se incubó con agitación a 28 °C por una hora. Las células se plaquearon en medio LB- agar con el antibiótico adecuado y se incubaron a 28 °C durante 2-3 días.

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

Las semillas de *M. truncatula* se escarificaron químicamente mediante inmersión en H₂SO₄ anhidro 98% (v/v) y agitación hasta la aparición de pequeños puntos negros en las semillas (alrededor de 5 por semilla). Una vez generados, se removió cuidadosamente todo el H₂SO₄ y se realizaron tres lavados con agua destilada fría. Posteriormente se realizó la esterilización de las semillas por incubación durante 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio 12 g/l. Se realizaron seis lavados con

agua destilada estéril dentro del flujo laminar. Utilizando pinzas estériles se transfirieron hasta 50 semillas por cada placa de petri conteniendo H₂O-agar 8 % (p/v). Las placas se colocaron invertidas a 4 °C en oscuridad durante al menos dos días para sincronizar la germinación y obtener radículas rectas. Al cabo de dicho tiempo, las semillas se transfirieron a 20 °C y se incubaron por aproximadamente 30 horas. A este tiempo las radículas presentaron la longitud adecuada (aproximadamente 10 mm) para realizar la transformación con *A. rhizogenes*.

4.4 Transformación de raíces de *M. truncatula* utilizando *A. rhizogenes* ARqua1

La transformación de raíces se realizó como fue descrito en (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Brevemente, dos días antes de la transformación se cultivaron las bacterias ARqua1 transformadas con la construcción de interés. Se utilizó una placa de LB-agar, conteniendo los antibióticos correspondientes, por cada 50 semillas a transformar. El día previo a la transformación se colocaron las semillas previamente esterilizadas a 20 °C para permitir la germinación coordinada. Luego de aproximadamente 30 horas se realizó la transformación en condiciones de esterilidad. Las plántulas se colocaron en una placa de petri conteniendo agua destilada estéril para evitar la deshidratación de las radículas. Cada radícula fue cortada unos 2-3 mm por encima de la punta de la raíz. La superficie seccionada se cubrió con el cultivo de *A. rhizogenes*. Posteriormente las plántulas se colocaron en una placa de petri conteniendo medio Fahraeus-agar ((Fahraeus, 1957) CaCl₂·2H₂O 0,114 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,12 g/l, citrato férrico 0,005 g/l, KH₂PO₄ 0,1 g/l, Na₂HPO₄ 0,15 g/l, KCl 3,73 mg/l, H₃BO₃ 1,55 mg/l, MnSO₄·H₂O 0,85 mg/l, CuSO₄·5H₂O 0,13 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 0,018 mg/l) suplementado con KNO₃ 8 mM y kanamicina 25 mg/l. Se colocaron cinco plántulas por placa de petri evitando que la parte aérea tome contacto con el medio. Las placas fueron selladas con *parafilm*, realizando pequeños cortes para permitir el intercambio gaseoso. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo Sanyo MIR-350HT a 20 °C, 50 % humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8 hs durante 7 días. Estas condiciones de temperatura y humedad mejoran la eficiencia de transformación. Al comenzar la segunda semana comienzan a formarse las primeras raíces y se modifica la temperatura a 25 °C, que es la temperatura óptima de crecimiento para *M. truncatula*. Al comienzo de la tercera semana las plántulas que desarrollaron raíces fueron transferidas a placas de petri cuadradas de 12

cm de lado conteniendo medio Fahraeus sin antibiótico ni fuente de nitrógeno para favorecer el desarrollo de la raíz transgénica. Luego de 5 días en este medio las plántulas pueden ser inoculadas o transferidas a otros medios para ensayos de nodulación.

5. Ensayos de nodulación y evaluación fenotípica de plantas compuestas

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

Semillas de *M. truncatula* Jemalong A17 se esterilizaron y germinaron como se detalló en la sección 4.3. Seguidamente se transfirieron a cajas de petri cuadradas de 12 cm conteniendo medio Fahraeus-agar sin fuente de nitrógeno cubierto con papel estéril. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo Sanyo MIR-350HT a 20 °C, 50 % humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8hs. Luego de 7 días se realizó la inoculación con *S. meliloti* 1021. Los rizobios se crecieron en medio TY (5g/l de triptona, 3 g/l de extracto de levadura y 0,6 g/l de CaCl₂·2H₂O. En los casos que se utilizó medio sólido se adicionó 15 g/l de agar), suplementado con streptomina 400µg/ml a 28 °C y 200 rpm de agitación. El día de la inoculación se largó un cultivo fresco que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 del cultivo de rizobio en agua destilada estéril. Cada placa se inoculó con 10 ml de esa dilución y se colocó en posición horizontal por una hora. El exceso de solución se retiró y se regresaron las cajas a la cámara. Las plantas no inoculadas fueron incubadas con 10 ml de agua destilada estéril como tratamiento control. A las 48 hs luego de la inoculación, se colectó tejido de raíz en ambas condiciones.

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

5.2 Ensayos de nodulación en perlita/arena

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

5.3 Evaluación fenotípica de plantas compuestas

Las plantas compuestas de 2 semanas fueron transplantadas a cajas de petri cuadradas conteniendo medio agar-Fahraeus suplementado con KNO_3 sin kanamicina. Luego de una semana en estas condiciones se evaluó el número de hojas de cada plántula. Se determinó la longitud de la parte aérea. La longitud de las raíces y de las raíces laterales se determinó para cada plántula luego de retirarla de la caja. Se utilizaron entre 26 y 36 plantas, que generaron entre 87 y 165 raíces secundarias para cada construcción

6. Técnica para la obtención de mRNPs

6.1 Purificación de mRNPs mediante RIP a partir de raíces de *M. truncatula*

La purificación se realizó a partir de aproximadamente 8 ml de tejido de raíces pulverizadas transformadas con las construcciones p35S:FH, p35S:RBP47-FH o p35S:DCP1-FH, mediante homogeneización con dos volúmenes de *buffer* de extracción de RNPs (*Buffer RNP* -ver componentes en tabla), que contiene inhibidores de proteasas

(SIGMA, P9599), detergentes y DTT como agente reductor. El extracto celular total se deja reposar en hielo 10 minutos, y luego es centrifugado a 1.500 xg a 4 °C por 15 minutos. Se toma el sobrenadante, y se transfiere a un tubo nuevo filtrando la muestra con papel *Miracloth* (22- 25 µm). Aquí se toma una alícuota denominada “*Total*” para la extracción de RNA total, y una fracción para usar en *Western blot* (**Fig. 20**). Con el fin de inmunopurificar las proteínas expresadas primero se unió el anticuerpo antiFLAG (α -FLAG), (SIGMA Aldrich, F1804) a las bolillas magnéticas (10009D, Life Technologies) incubando 3,5 µl de anticuerpo por cada 50 µl de bolillas con agitación en hielo por una hora. Luego fueron separadas del sobrenadante utilizando imanes. Una vez purificadas, estas bolillas se introdujeron en las muestras para permitir su unión con los complejos 35S:RBP47-FH-mRNA o 35S:DCP1-FH-mRNA, a través del anticuerpo. Este paso se realizó en hielo con agitación orbital por dos horas. Se colectaron las bolillas con los complejos 35S:RBP47-FH-mRNA o 35S:DCP1-FH-mRNA en el borde del tubo utilizando imanes, y se tomó una alícuota del sobrenadante que contiene los componentes del extracto celular que no se unieron al anticuerpo (“*Unbound*”). Luego se lavaron las bolillas con 1 ml de *buffer RNP*, y posteriormente 4 lavados con 700 µl de *buffer WB* (ver componentes en tabla). Se tomó una alícuota denominada “*RIP*”, y se guardó el resto de las bolillas en freezer a -80 °C para su posterior utilización, ya sea para la extracción de RNA, la preparación de bibliotecas para secuenciación masiva, o para un análisis por *Western blot*.

	Buffer de extracción RNP (RNP)	Washing Buffer (WB)
Tris- HCl (pH= 9) ^a	200 mM	200 mM
Acetato de potasio ^a	110 mM	110 mM
Tritón X-100 ^a	0,5% v/v	0,5% v/v
Tween 20 ^a	0,1% v/v	0,1% v/v
Cocktail inhibidor de proteasas	1,5% v/v	
Ditiotreitol (DTT)	1 mM	1 mM

^a Soluciones previamente autoclavadas

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

7.1 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo a partir de hojas de *M. truncatula* Jemalong A17 siguiendo el protocolo descrito (Dellaporta *et al.*, 1983). El tejido se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero. El polvo se transfirió a un tubo y se añadieron 15 ml de *buffer* de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,05 M pH 8,0; NaCl 0,5 M; β -mercaptoetanol 0,01 M). Se agregó 1 ml de SDS 20 % (p/v), la mezcla se agitó con vórtex y se incubó 10 min a 65 °C. Luego, se añadieron 5 ml de acetato de potasio 5 M y se mezclaron por inversión. La muestra se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una malla de nylon de 20 μ m y se añadieron 10 ml de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó 30 minutos a -20 °C. La muestra se centrifugó a 17000 xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se evaporó el isopropanol remanente a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 1,4 ml de *buffer* TE pH 7,4 y se mantuvo toda la noche a 4 °C. Con el objeto de precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 75 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se mezclaron por inversión y se agregaron 500 μ l de isopropanol. La muestra se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó a 17.000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 200 μ l de 1 X TE, pH 7,4 manteniendo toda la noche a 4 °C. Para eliminar el RNA presente en la muestra se digirió con 10 μ g/ml de RNAasa libre de DNAasa (Promega) durante 30 minutos a 37 °C. Se agregó acetato de amonio 2 M pH 7,5. Se realizó una extracción con 0,5 volúmenes de fenol y 0,5 volúmenes de cloroformo- isoamílico (24:1). La mezcla se agitó 2 minutos y se centrifugó en una microcentrífuga a 17.000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una extracción con cloroformo-isoamílico (24:1). Finalmente, el DNA genómico se precipitó desde la fase acuosa con acetato de sodio 0,2 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol a -20 °C. La muestra se colocó 10 minutos en hielo y se centrifugó a 17.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 500 μ l de 70 % (v/v) etanol, a 4 °C. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de

agua bidestilada incubando toda la noche a 4 °C. El DNA genómico obtenido se almacenó a 4 °C.

7.2 Extracción de RNA

7.2.1 Extracciones de RNA a partir de tejido de raíz

Para la extracción de RNA se pulverizó el tejido con mortero utilizando N₂ líquido. En caso de no ser procesado inmediatamente, se almacenó en freezer a -80 °C. El RNA se extrajo siguiendo el protocolo provisto con el kit *NucleoSpin RNA* (Macherey- Nagel). La elución se realizó con 50 µl de agua estéril y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La concentración de las muestras se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y se estimó su pureza a través de la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La integridad del RNA se observó a través de una electroforesis no desnaturizante, visualizándose las bandas correspondientes al rRNA.

7.2.2 Extracciones de RNA a partir de muestras de inmunopurificaciones de gránulos

Las fracciones *Total* y *RIP* fueron utilizadas para la extracción de RNA. Para ambas muestras se utilizó una extracción con Trizol (Invitrogen) siguiendo las condiciones detalladas por el proveedor. En forma resumida, a cada muestra se agregó 700 µl de reactivo de Trizol y se agitó con vórtex durante 30 seg. Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se realizó una extracción con 200 µl de cloroformo. Se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Se repitió la extracción con cloroformo conservando la fase acuosa. El RNA se precipitó con 500 µl de isopropanol manteniendo toda la noche -20 °C. En este paso, para ayudar la precipitación de las muestras *RIP* se agregó 1 µl de glucógeno 15 mg/ml (GlycoBlue, Invitrogen AM9515) para ayudar a la recuperación de los ácidos nucleicos durante la precipitación con alcohol. Luego se centrifugó a 12.000 xg durante 45 minutos a 4 °C. Los precipitados de RNA fueron lavados con etanol 70 % (v/v). Finalmente, el RNA se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril y se calentó a 65 °C durante 5 minutos

para favorecer la resuspensión del precipitado. El RNA se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Se evaluaron la concentración y la integridad igual que para las muestras de RNA total de raíz (sección 7.2.1).

8. Métodos utilizados para el análisis de proteínas

8.1 Preparación de muestras de proteínas

Las proteínas de raíces fueron extraídas a partir de tejido pulverizado en nitrógeno líquido. Se utilizaron 150 µl de tejido extraídos con 150 µl de *buffer* de carga SDS 2X (Tris-HCl 10 mM pH 7,0, EDTA 2 mM, SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 0,5 % (v/v), glicerol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,5 mg/ml). Las muestras se desnaturalizaron mediante incubación durante 5 minutos a 100 °C previo a la siembra.

Las fracciones purificadas de *RIP* fueron extraídas en *buffer* RNP (sección 6.1), mientras que las fracciones *Total* y *Unbound* fueron precipitadas previamente con dos volúmenes de etanol durante toda la noche a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 16.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Luego, fueron resuspendidas en *buffer* de siembra SDS, y tratadas de la misma manera que los extractos de raíces.

8.2 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

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

(p/v) aplicando una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel durante 1 hora y media aproximadamente.

8.3 Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

Las proteínas, previamente separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond ECL*, *Amersham*) empleando el sistema Miniprotean III (*BioRad*). La transferencia se realizó en una solución Tris-HCl 25 mM, glicina 150 mM pH 8,0, metanol 20 % (v/v) a 4 °C, aplicando un voltaje constante de 100 V durante 60 minutos. Seguidamente se verificó la transferencia mediante la tinción con una solución de Ponceau 2% (p/v) durante 5 minutos. Se lavaron las membranas con agua destilada hasta la desaparición del color. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon por incubación durante 1 hora en buffer TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 % (v/v)) conteniendo leche descremada en polvo 5 % (p/v). Alternativamente, el bloqueo se realizó incubando toda la noche a 4 °C.

Las construcciones 35S:RBP47-FH y 35S:DCP1-FH conteniendo el epítopo FLAG se detectaron utilizando una dilución 1:1000 (v/v) del anticuerpo comercial α -FLAG (SIGMA Aldrich, F1804) de ratón en TBS-T. Con esta solución se realizó la incubación de la membrana al menos por una hora. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante cinco lavados de 10 minutos con buffer TBS-T. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti- ratón en dilución 1:20.000 durante al menos una hora (*Amersham*, *GE Healthcare*). Este anticuerpo está conjugado a la enzima peroxidasa. La visualización se llevó a cabo utilizando la reacción quimioluminiscente catalizada por la peroxidasa, en presencia de agua oxigenada 30 volúmenes, luminol 250 mM y ácido cumárico 90 mM. Por último, las membranas se expusieron entre 20 y 40 minutos a placas autorradiográficas (*Kodak Medical X-ray Film General Purpose Green*).

9. Métodos para la cuantificación de los niveles de transcriptos

9.1 Tratamiento con DNAsa

Se realizó la digestión de DNA genómico para las muestras de RNA total extraído a partir de raíces *wild type* o transgénicas. También fue utilizado para las muestras *Total*

de la técnica de RIP. En cada caso, se digirió 1 µg de RNA con 1 U de la enzima RQ1 DNAasa libre de RNAasa (*Promega*) utilizando el *buffer* suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 µl. Luego de incubar durante una hora a 37 °C se agregó 1 µl de la solución *Stop* (EGTA 10 mM, *Promega*). Se incubó durante 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

9.2 Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó con 1 µg de RNA (siempre que fuera disponible esa cantidad). La primera etapa consistió en el agregado de 250 ng de oligo dT. Luego, se incubó durante 5 minutos a 70 °C y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente se agregó una mezcla conteniendo 200 U de la enzima transcriptasa reversa (MLV RT, *Promega*), dNTPs a una concentración final de 0,5 mM cada uno y *buffer* 1X (*Promega*), llevando a un volumen final de 25 µl con H₂O bidestilada estéril. Luego se incubó durante una hora a 42 °C y finalmente 15 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

9.3 Ensayos de qPCR

Cinco µl de una dilución 1/10 de la síntesis de la primera hebra de cDNA fueron utilizados como molde en una reacción de PCR cuantitativa. Se utilizaron 5 pmoles de cada *primer* en un volumen final de 20 µl. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *iQ SYBR® Green Supermix* de *BioRad*. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real *CFX96 Real-Time System* de *BioRad* con una primera etapa a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 20 seg a 92 °C, 30 seg a 52 °C y 25 seg a 72 °C. La amplificación de un único producto fue verificada mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa 1 % (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 para como mínimo 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 transcritos de referencia *ACTINA11* y de *HISTONA3L* mediante GNORM (Vandesompele et al., 2002). Estos transcritos se utilizaron para la normalización de los datos según se describió previamente (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa *GraphPad v 6.0* (*GraphPad Software Inc*).

10. Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizados para el análisis de secuencias

10.1 Herramientas bioinformáticas

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

- **CLUSTALO** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>): para el alineamiento de las secuencias de proteínas de *M. truncatula* con sus homólogas de otras especies se utilizó la herramienta web *Clustal Omega*, basada en el método *neighbor-joining*.

- **BOXSHADE** (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html): este programa se utilizó para resaltar en forma gráfica los sitios conservados a partir de los alineamientos resultantes del Clustalo.

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

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

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

- **VISUAL GENE DEVELOPER** (<http://www.visualgenedeveloper.net/Download.html>): software utilizado para el cálculo de la proporción GC y energía libre de Gibbs (ΔG°) de los mRNAs.

- **PLANT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY MAP** (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>): Plataforma web para la búsqueda de elementos regulatorios en *cis* sobre los promotores de genes que se expresaron diferencialmente en presencia de rizobios, y posible interacción con factores de transcripción en plantas.

10.2 Bases de datos de secuencias

- **Genoma de *M. truncatula*** <https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/>. Genoma actualizado y lanzado en 2018 por el INRA, Toulouse, Francia.
- **Genoma de *M. truncatula*** <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>. Este sitio contiene la versión 4.0v1 del genoma en el transcurso de este trabajo.
- **Genoma de *P. vulgaris*, cultivar mesoamericano BAT93** (Vlasova *et al.* 2016), el cual está disponible en <http://denovo.cnag.cat/genomes/bean/>. Utilizado para la búsqueda de los genes ortólogos a los genes expresados diferencialmente en un cultivar andino, línea G19833 (Schmutz *et al.*, 2014).
- **DFCI gene index** (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>). El proyecto *Gene Index* contiene secuencias expresadas de transcriptos (ESTs) para diferentes especies de plantas. Esta base de datos contiene los modelos génicos posibles y sus variantes. Fue utilizado para la búsqueda de las secuencias no traducidas de los transcriptos analizados.
- ***Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA)** (<http://mtgea.noble.org/v3/>). Este sitio contiene un compendio de los perfiles de expresión para la mayoría de los genes de *M. truncatula*. Esta base de datos abarca diferentes estadios del desarrollo en los distintos órganos bajo distintos tratamientos (Benedito *et al.*, 2008, He *et al.*, 2009).

10.3 Análisis bioinformáticos

- Análisis de elementos regulatorios e interacción con factores de transcripción.

Se corrió el análisis en la plataforma *PLANT TRANSCRIPTIONAL REGULATORY MAP*, utilizando los parámetros que aparecen por *default*, sobre las secuencias promotoras obtenidas desde el genoma de poroto variedad mesoamericana BAT93, cuyas

secuencias se encuentran disponibles en formato FASTA, pero que aún no cuenta con una anotación funcional o una interface para su acceso (Vlasova et al., 2016). Sobre este genoma, se tomaron las secuencias desde la posición -1500 a la +100, con respecto al mORF. La base de datos de los factores de transcripción de poroto que utilizó esta plataforma, es de la variedad andina G19833, el único completo y caracterizado disponible hasta el momento (Schmutz et al., 2014). Previamente al ingreso de las secuencias de los promotores obtenidas, se filtraron algunas que no alcanzaban una extensión de 300 nts.

11. Secuencias de primers

Tabla 1. Lista de *Primers* utilizados en este trabajo

Nombre primer	Secuencia 5' → 3'
ML UBP1f-ATG	CACC ATG GGT GTG TTG CG
ML UBP1r	CTG ATA ATA CAT CAT TTG CTG TGC AGC
ML RBP47f-ATG	CACC ATG CAA CCA GGA GGA C
ML RBP47r	ACT ATA TCC TAA TTG CTG TTG CTG CTG AG
ML 2017 XRN4f-ATG	CACC ATG GGA GTG CCA G
ML 2017 XRN4r	CCA TTG ATT CCC CTG CTC TG
ML DCP1f-ATG	CACC ATG TCT CAG AAC GGG AAA TTG ATG
ML DCP1r	TGA TTG ATG AGC ATT CAG CAG CGC TTT A
ML2017 RBP47 f-743	ACC TTG GCA CAC AGA CTT CAA AAG
ML2017 DCP1 f-694	CTG CCA ACC TTG CAG ATA CCA
35S Fw	GAGGACACGCTCGAGTATAAGAGC
OCS Rv	CATGCGATCATAGGCGTCTCG
ML 2017 pK7R Fw_764	CCT TGG AGC CGT ACT GGA AC
pK7YWG2	TGA ACT TGT GGC CGT TTA CGT
M13f	GTAAACGACGGCCAG
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
MtENOD11-F343	ATC CCA CAA TAT GCC TCC AA
MtENOD11-R523	AGG AAG TGG CTT TAG CA
MtENOD40-F	AGG AAT CCA TTG CCT TTT TGT GAC
MtENOD40-Rv	CCC TAC ACA CTC TCC CTC CA
MtHIS3-F	ATT CCA AAG GCG GCT GCA TA
MtHIS3-Rv	CTT TGC TTG GTG CTG TTT AGA TGG
MtACT-F	TGG CAT CAC TCA GTA CCT TTC AAC AG
MtACT-Rv	ACC CAA AGC ATC AAA TAA TAA GTC AAC C
ML2017 2g010590-f-CAP	GCA GTG AGG TTG TGG GTG AAT G
ML2017 2g010590-r-CAP	ACT TAG TAT GGC TTT TGA CCA ACA TAG TTG
ML2017 5g020170-f- MYB TF	AAT ATA GCC ATG TTT GTT GGA GGG AC
ML2017 5g020170-r- MYB TF	GTG TTC AAT AGA GCT CCA AGT TCC TTA G
ST-qSUPuP Fw	GCA TAT GCA AGA TGT AAT CC
ST-qSUPuP Rv	ATG GAG ACA AGT GTA ATG CT
MtCRE1-F	GCA CCA CCC TTT GGC TTC TAA G
MtCRE1-Rv	CCA CTA AGT AGC GGC CTT TCG
MtDMI1-F	GTT GCT GCA GAT GGA GGG AAG AT
MtDMI1-Rv	GCG CCA GCC ACA AAA CAG TAT
MtDMI2-F	TGG ACC CCT TTT GAA TGC CTA TG
MtDMI2-Rv	TCC ACT CCA ACT CTC CAA TGC TTC
MtNFP-F	TCT CAT GCT CTT TTT CTT GTC CTC A
MtNFP-Rv	CTC GGC TTC TAT GTT ACT GGC TTT
MtNSP1-F	GTG GTT AGA AAA TCT GGT GGG
MtNSP1-Rv	GTG TCA ATG CTC GAA GAC CA
MtNSP2-F	GAC ACA CTT GCT GCT TTC CA
MtNSP2-Rv	AAT GCG GTT ATC CGA AGA TG

12. Microscopía confocal

La microscopía confocal fue realizada con muestras de raíz de *M. truncatula* u hojas de *N. benthamiana* para el análisis de la localización subcelular de los mRNPs con un microscopio confocal Leica (SP5) con un objetivo de inmersión 63X en segmentos de raíz *wt* y raíces transgénicas. Los espectros de emisión utilizados para detectar las

fluorescencias fueron los siguientes: RFP (604 nm - 701 nm), e YFP (500 nm - 600 nm). Las imágenes y videos fueron capturados por la cámara del microscopio Leica SP5 (servicio provisto por la plataforma de microscopía avanzada PMA-FCEN, de la Universidad Nacional de La Plata). Ambos servicios son regulados por el servicio de microscopía Nacional (<http://turnos.microscopia.mincyt.gob.ar/sistema/#>). Las imágenes se procesaron con el *software Leica Application Suite X 3.3.0.16799* (Leica Microsystems).

12.1 Generación de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electrocompetentes

El procedimiento para la generación de *A. tumefaciens* GV3101 electrocompetentes es el mismo que se describió en la sección 4.1 para *A. rhizogenes* ARqua1.

12.2 Transformación de células de *A. tumefaciens* GV3101 mediante electroporación

El procedimiento para la transformación de *A. tumefaciens* GV3101 por electroporación es el mismo descrito en la sección 4.2 para *A. rhizogenes* ARqua1.

12.3 Ensayos de localización subcelular por fluorescencia en *N. benthamiana*

Cepas de *A. tumefaciens* GV3101 fueron transformadas con las construcciones correspondientes para llevar a cabo los experimentos de localización subcelular. En todos los ensayos fue utilizada una cepa de *A. tumefaciens* GV3101 que expresa la proteína supresora del silenciamiento P19, permitiendo altos niveles de expresión de proteínas heterólogas (Voinnet et al., 2003). Para realizar la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* se partió de cultivos líquidos de las cepas correspondientes incubados toda la noche a 28 °C. Estos fueron centrifugados a 2600 $\times g$ a 4 °C durante 12 min, y el precipitado fue resuspendido en 5 ml de *agromix* (MgCl₂ 10 mM, MES/KOH 10 mM, pH 5.6 y acetosiringona 150 mM). El homogenato se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y fue diluido hasta una DO₆₀₀ igual a 1. Por último se mezclaron las cepas necesarias para cada experimento en volúmenes iguales y se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* haciendo presión con una jeringa sin aguja como fue descrito por

Voinnet et al., 2003. Muestras de hojas fueron analizadas mediante microscopía confocal 1 y 2 días luego de la agroinfiltración.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, O.M., López, M.V., and Riccillo, P.M.** (2001). The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J. Biotechnol.* **91**: 181–188.
- Aguilar, O.M., López, M.V., Riccillo, P.M., Gonzalez, R.A., Pagano, M., Grasso, D.H., Pühler, A., and Favelukes, G.** (1998). Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3520–3524.
- Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E.** (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 13548–13553.
- Aizer, A., Kalo, A., Kafri, P., Shraga, A., Ben-Yishay, R., Jacob, A., Kinor, N., and Shav-Tal, Y.** (2014). Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *J. Cell Sci.* **127**: 4443–4456.
- Akçay, E.** (2015). Evolutionary models of mutualism. *Mutualism*: 57–76.
- Alberti, S. and Hyman, A.A.** (2016). Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *BioEssays* **38**: 959–968.
- Alonso, J.M. and Stepanova, A.N.** (2015). *Plant Functional Genomics IN Series Editor.*
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., and Yadav, R.C.** (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **19**: 307–321.
- Anderson, P. and Kedersha, N.** (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**: 803–808.
- Anderson, P. and Kedersha, N.** (2009). RNA granules: Post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 430–436.
- Ané, J.M. et al.** (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* (80-.). **303**: 1364–1367.
- De Araújo, S.S., Amaral Duque, A.S.R.L., Dos Santos, D.M.M.F., and Fevereiro, M.P.S.** (2004). An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **78**: 123–131.
- Ariel, F. et al.** (2012). Two Direct Targets of Cytokinin Signaling Regulate Symbiotic Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **24**: 3838–3852.
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M.** (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1324–1332.
- Von Arnim, A.G., Jia, Q., and Vaughn, J.N.** (2014). Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Sci.* **214**: 1–12.
- Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J., and Song, H.** (2013). Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1829**: 580–589.
- Arrighi, J.-F.** (2006). The *Medicago truncatula* Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes. *Plant Physiol.* **142**: 265–279.
- Arrighi, J.-F., Godfroy, O., de Billy, F., Saurat, O., Jauneau, A., and Gough, C.** (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 9817–9822.
- Bahn, J.H., Greer, C., Peng, G., Xiao, X., Lee, J.-H., and Li, G.** (2012). Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing. *Genome Res.* **22**: 142–150.
- Bailey-Serres, J., Sorenson, R., and Juntawong, P.** (2009). Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci.* **14**: 443–453.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., and Li, W.W.** (2006). MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **34**: 369–373.
- Bánfai, B. et al.** (2012). Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Res.* **22**: 1646–1657.
- Barbarese, E. et al.** (2013). Conditional Knockout of Tumor Overexpressed Gene in Mouse Neurons Affects RNA Granule Assembly, Granule Translation, LTP and Short Term Habituation. *PLoS One* **8**.
- Basbous-Serhal, I., Pateyron, S., Cochet, F., Leymarie, J., and Bailly, C.** (2017). 5' to 3' mRNA Decay Contributes to the Regulation of Arabidopsis Seed Germination by Dormancy. *Plant Physiol.* **173**: 1709–1723.
- Basbous-Serhal, I., Soubigou-Taconnat, L., Bailly, C., and Leymarie, J.** (2015). Germination Potential of Dormant and Nondormant Arabidopsis Seeds Is Driven by Distinct Recruitment of Messenger RNAs to Polysomes. *Plant Physiol.* **168**: 1049–1065.
- van Batenburg, F.H.D., Jonker, R., and Kijne, J.W.** (1986). *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiol. Plant.* **66**: 476–480.
- Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Ripodas, C., Ariel, F., Frances, L., Crespi, M., Gamas, P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., de CARVALHO-NIEBEL, F., and Niebel, A.** (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, S.J., Gregory, B.D., Crespi, M., and Bailey-Serres, J.** (2017). Global analysis of

- ribosome-associated noncoding RNAs unveils new modes of translational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E10018–E10027.
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J.R., Claverie, J.M., and Gautheret, D. (2000). Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* **10**: 1001–1010.
- Benedito, V.A. et al. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **55**: 504–513.
- Bitocchi, E. et al. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol.* **197**: 300–313.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., and Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: E788–E796.
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M.L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., and Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus* spp.) as a Model for Understanding Crop Evolution. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–21.
- Blair, M.W., Iriarte, G., and Beebe, S. (2006). QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 1149–1163.
- Blanco, F.A., Peltzer Meschini, E., Zanetti, M.E., and Aguilar, O.M. (2009). A Small GTPase of the Rab Family Is Required for Root Hair Formation and Preinfection Stages of the Common Bean-Rhizobium Symbiotic Association. *Plant Cell Online* **21**: 2797–2810.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 695–700.
- Boscari, A., del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.-L., Delledonne, M., and Puppo, A. (2012). Expression Dynamics of the *Medicago truncatula* Transcriptome during the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*: Which Role for Nitric Oxide? *Plant Physiol.* **161**: 425–439.
- Boussadia, O., Niepmann, M., Creancier, L., Prats, A.-C., Dautry, F., and Jacquemin-Sablon, H. (2003). Unr Is Required In Vivo for Efficient Initiation of Translation from the Internal Ribosome Entry Sites of both Rhinovirus and Poliovirus. *J. Virol.* **77**: 3353–3359.
- Branco-Price, C., Kaiser, K.A., Jang, C.J.H., Larive, C.K., and Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **56**: 743–755.
- Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., and Hyman, A.A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* (80-.). **324**: 1729–1732.
- Brangwynne, C.P., Mitchison, T.J., and Hyman, A.A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 4334–4339.
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K.S., Wen, J., Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., and Murray, J.D. (2014). The root hair “infectome” of *medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell* **26**: 4680–4701.
- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* (80-.). **310**: 486–489.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., and Thies, J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant Soil* **174**: 143–180.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (80-.). **320**: 1185–1190.
- Broughton, W.J., Hern, aacute, Ndez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil* **252**: 55–128.
- Browning, K.S. and Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *Arab. B.* **13**: e0176.
- Brussel, A.A.N. Van, Bakhuizen, R., Spronsen, P.C. Van, Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W. (1992). Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic. *Science* (80-.). **257**: 1–3.
- Buchan, J.R. (2014). Assembly , function , and connections with disease.: 1–12.
- Buchan, J.R., Muhlrad, D., and Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **183**: 441–455.
- Buchan, J.R. and Parker, R. (2009). Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Mol. Cell* **36**: 932–941.
- Cabili, M., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* **25**: 1915–1927.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ane, J.-M., and Oldroyd, G.E.D. (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of

- legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 14348–14353.
- Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F.** (2012). Medicago truncatula ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiol.* **160**: 2155–2172.
- Chang, T.C., Yamashita, A., Chen, C.Y.A., Yamashita, Y., Zhu, W., Durdan, S., Kahvejian, A., Sonenberg, N., and Shyu, A. Bin** (2004). UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev.* **18**: 2010–2023.
- Chantarachot, T. and Bailey-Serres, J.** (2017). Polysomes, stress granules and processing bodies: a dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. *Plant Physiol.* **176**: pp.01468.2017.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G. V, Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A., Sanders, D., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.D.** (2016). Symbiotic Calcium Oscillations. *Science* (80-.). **352**: 1102–5.
- Chen, M. and Manley, J.** (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches *Mo. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 741–754.
- Chen, X.** (2012). Small RNAs in development – insights from plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**.
- Chu, C., Zhang, Q., da Rocha, S.T., Flynn, R., Bharadwaj, M., Calabrese, J., and Chang, H.** (2017). Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell* **161**: 404–416.
- Clúa, J.** (2018). Bases moleculares de la interacción simbiótica eficiente entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*.
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2018). Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes (Basel)*. **9**.
- Coller, J. and Parker, R.** (2004). Eukaryotic mRNA Decapping. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 861–890.
- Collins, K. and Hogg, J.R.** (2007). RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct composition and regulation. *Rna* **13**: 868–880.
- Combiér, J., Frugier, F., Boualem, A., El-yahyaoui, F., Moreau, S., Verni, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A.** (2006). is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169. *Genes Dev.*: 3084–3088.
- Cook, D.R.** (1999). Medicago truncatula — a model in the making ! Commentary. *Commentary* **2**: 301–304.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., and Kondorosi, A.** (1994). enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* **13**: 5099–5112.
- D'Erfurth, I., Cosson, V., Eschstruth, A., Lucas, H., Kondorosi, A., and Ratet, P.** (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *Plant J.* **34**: 95–106.
- Dalla Via, V., Narduzzi, C., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2015). Changes in the Common Bean Transcriptome in Response to Secreted and Surface Signal Molecules of *Rhizobium etli*. *Plant Physiol.* **169**: 1356–1370.
- Danecek, P., Nellåker, C., McIntyre, R.E., Buendia-Buendia, J.E., Bumpstead, S., Ponting, C.P., Flint, J., Durbin, R., Keane, T.M., and Adams, D.J.** (2012). High levels of RNA-editing site conservation amongst 15 laboratory mouse strains. *Genome Biol.* **13**: 26.
- Dang, Y., Kedersha, N., Low, W.K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P., and Liu, J.O.** (2006). Eukaryotic initiation factor 2 α -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* **281**: 32870–32878.
- Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe, M., and Pankratz, S.H.** (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1140–1150.
- Debellé, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C., and Dénarié, J.** (1996). The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* **22**: 303–314.
- Decker, C.J. and Parker, R.** (2012). cshperspect-TRA-a012286.: 1–16.
- Delaux, P.M., Radhakrishnan, G., and Oldroyd, G.** (2015). Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. *Curr. Opin. Plant Biol.* **26**: 95–99.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., and Lavin, M.** (2006). Phylogeny of the Genus <i>Phaseolus</i> (Leguminosae): A Recent Diversification in an Ancient Landscape. *Syst. Bot.* **31**: 779–791.
- Delrot, S., Atanassova, R., and Maurousset, L.** (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1465**: 281–306.
- Denarie, J. and Debellé, F.** (2002). *Rhizobium* Lipo-Chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503–535.
- Díaz, L.M. and Blair, M.W.** (2006). Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 143–154.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., and Rechavi, G.** (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **485**: 201–206.
- Donà, M. et al.** (2013). RNA-Seq analysis discloses early senescence and nucleolar dysfunction triggered by Tdp1 α depletion in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **64**: 1941–1951.

- Duhamel, M. and Vandenkoornhuyse, P. (2013). Sustainable agriculture: Possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci.* **18**: 597–600.
- Dunn, J.G., Foo, C.K., Belletier, N.G., Gavis, E.R., and Weissman, J.S. (2013). Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *Elife* **2013**: 1–32.
- Ehrhardt, D., Wais, R., and Long, S. (1996). Calcium -spiking in Plant Root Hairs Responding to Rhizobium Nodulation Signals. *Cell* **85**: 1–21.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966.
- Erickson, S.L. and Lykke-Andersen, J. (2011). Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J. Cell Sci.* **124**: 293–297.
- Erisman, J.W., Galloway, J.N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N.B., Roxana Petrescu, A.M., Leach, A.M., and de Vries, W. (2013). Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**.
- Estrada-Navarrete, G. et al. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: A tool for functional genomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1385–1393.
- Fahraeus, G. (1957). The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology* **16**: 374–381.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 61–76.
- Floor, S.N. and Doudna, J.A. (2016). Tunable protein synthesis by transcript isoforms in human cells. *Elife* **5**: 1–25.
- Fournier, J., Timmers, A.C.J., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G. (2008). Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiol.* **148**: 1985–1995.
- Fowler, D. et al. (2013). The global nitrogen cycle in the 21st century. *Philosophical Trans. R. Soc. London, B Biol. Sci.* **368**: 20130165.
- Galloway, J.N., Leach, A.M., Bleeker, A., and Erisman, J.W. (2013). A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**.
- Galloway, J.N., Sutton, M.A., Seitzinger, S.P., Bekunda, M., Townsend, A.R., Martinelli, L.A., Cai, Z., Galloway, J.N., Erisman, J.W., and Freney, J.R. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* (80-.). **320**: 889–892.
- Gept, P. (1998). Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience* **33**: 1124–30.
- Gepts, P. and Bliss, F.A. (1988). Dissemination Pathways of Common Bean. New York **42**: 86–104.
- Gepts, P., Osborne, T., Rashka, K., and Bliss, F.A. (1986). Phaseolin-Protein Variability in Wild Forms and Landraces of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for Multiple Centers of Domestication Author (s): P . Gepts , T . C . Osborn , K . Rashka , F . A . Bliss Published by : Springer on behalf of. *Botany* **40**: 451–468.
- Gerland, P., Raftery, A., Sevcikova, H., Li, N., Gu, D., and Spoorenberg, T. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science* (80-.).
- Geurts, R., Lillo, A., and Bisseling, T. (2012). Exploiting an ancient signalling machinery to enjoy a nitrogen fixing symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 438–443.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., and Anderson, P. (2004). Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* **15**: 5383–5398.
- Gobbato, E. et al. (2012). A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol.* **22**: 2236–2241.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell Online* **18**: 2680–2693.
- Graham, P.H. and Vance, C.P. (2003). Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol.* **131**: 872–877.
- Grant, C.E., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2011). FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**: 1017–1018.
- Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Dev. Cell* **14**: 854–866.
- Grillo, G., Turi, A., Licciulli, F., Mignone, F., Liuni, S., Banfi, S., Gennarino, V.A., Horner, D.S., Pavesi, G., Picardi, E., and Pesole, G. (2009). UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): A collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **38**: 75–80.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., and Parniske, M. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13, Is Required for Rhizodermal Infection by Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Rhizobia but Dispensable for Cortical Endosymbiotic Development. *Plant Cell Online* **22**: 2509–2526.
- Gruber, N. and Galloway, J.N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**: 293–296.
- Guttman, M. et al. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**: 223–227.
- Guttman, M. and Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**: 339–346.

- Guttman, M., Russell, P., Ingolia, N.T., Weissman, J., and Lander, E.S. (2013). Ribosome profiling provides evidence that large non-coding RNAs do not encode proteins. *Cell* **154**: 240–251.
- Hanano, S., Sugita, M., and Sugiura, M. (1996). Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **31**: 57–68.
- Hari, A.E. and Bisseling, T. (1998). Responses of Plant to Nod Factors. In *The Rhizobiaceae*, H.P. Spaink, ed (Kluwer Academic Publishers).
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.-P., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002). Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 16719–16724.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of CcAMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J.* **63**: 141–154.
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y., and Udvardi, M.K. (2009). The Medicago truncatula gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**.
- Hernandez-Lucas, I. (1995). Phylogenetic Relationships and Host Range of. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2775–2779.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational Regulation of Gcn4 and the General Amino Acid Control of Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 407–450.
- Hobecker, K.V., Reynoso, M.A., Bustos-Sanmamed, P., Wen, J., Mysore, K.S., Crespi, M., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E. (2017). The microRNA390/TAS3 pathway mediates symbiotic nodulation and lateral root growth. *Plant Physiol.* **174**: 2469–2486.
- Hofer, J.M.I. and Noel Ellis, T.H. (2014). Developmental specialisations in the legume family. *Curr. Opin. Plant Biol.* **17**: 153–158.
- Hofmann, N. (2014). No Scalpel Needed: Translatome of Pollen Tubes Growing within the Flower in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 517–517.
- Høglund, N. et al. (2009). Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of Lotus japonicus mutant and wild-type plants. *PLoS One* **4**.
- Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulphide bonds. In, pp. 95–96.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J. Biol. Chem.* **264**.
- Horváth, B. et al. (2011). Medicago truncatula IPD3 Is a Member. *pdf.* **24**: 1345–1358.
- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schell, J., and Kondorosi, A. (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in Rhizobium is mediated by a plant-signal, interacting with the nodD gene product. *EMBO J.* **6**: 841–848.
- Howarth, R.W., Rastetter, E.B., Cassman, K., Field, C.B., Vitousek, P.M., Grimm, N.B., Marino, R., Crews, T., Cleveland, C., and Martinelli, L. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **57**: 1–45.
- Hoyle, N.P., Castelli, L.M., Campbell, S.G., Holmes, L.E.A., and Ashe, M.P. (2007). Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J. Cell Biol.* **179**: 65–74.
- Hubstenberger, A. et al. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol. Cell* **68**: 144–157.e5.
- Hubstenberger, A., Cameron, C., Shtofman, R., Gutman, S., and Evans, T. (2012). A network of PUF proteins and Ras signaling promote mRNA repression and oogenesis in C. elegans. *Dev. Biol.* **366**: 218–231.
- Hudson, M., Ringli, C., Boylan, M.T., and Quail, P.H. (1999). The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **13**: 2017–2027.
- Huelga, S.C. et al. (2012). Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep.* **1**: 167–178.
- Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N., and Jackson, R.J. (1999). unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **13**: 437–448.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dictenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512–515.
- Ilipowicz, W.F. (2006). Amino Acid Deprivation Induces Translational Up-regulation of CAT-1 mRNA in Huh7 Cells. *LXXI*.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., and Weissman, J.S. (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* (80-.). **324**: 1–6.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., and Watanabe, Y. (2007). Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.* **581**: 2455–2459.
- J.Gage, D. (2017). 2004 Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 203.
- Jain, S., Wheeler, J.R., Walters, R.W., Agrawal, A., Barsic, A., and Parker, R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* **164**: 487–498.
- Jardinaud, M.-F. 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.* **33**: pp.00711.2016.

- Jemalong, G. (1995). TE7, An Inefficient Symbiotic Mutant of *Medicago truncatula*. *J. Cell Biol.*: 53–62.
- Ji, L. et al. (2011). ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* **7**: 1–14.
- Jiao, Y. and Meyerowitz, E.M. (2010). Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 1–14.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the. *Nature* **5**: 619–633.
- Journet, E.-P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., and Gianinazzi-Pearson, V. (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: A Novel RPRP-Encoding Early Nodulin Gene Expressed During Mycorrhization in Arbuscule-Containing Cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 737–748.
- Juntawong, P. and Bailey-Serres, J. (2012). Dynamic Light Regulation of Translation Status in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **3**: 1–16.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J. (2013a). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: E203–E212.
- Juntawong, P., Sorenson, R., and Bailey-Serres, J. (2013b). Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **74**: 1016–1028.
- Kanamori, N. et al. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *PNAS* **103**.
- Karimi, M., Meyer, D., and Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. **10**: 8–10.
- Kastenmayer, J.P. and Green, P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/ Rat1p, functions in the cytoplasm. *PNAS* **97**.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S.K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., and Bansal, K.C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **13**.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* **33**: 955–965.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J. (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 460–465.
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A., and Bailey-Serres, J. (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **38**: 823–839.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I., Stahl, J., and Anderson, P. (2002). Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNA^{Met})– Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules. *Mol. Biol. Cell* **13**: 195–210.
- Kedersha, N., Cho, M., Yacono, P., Chen, S., Gilks, N., Golan, D., and Anderson, P. (2000). Dynamic Shuttling of TIA-1 Accompanies the Recruitment of mRNA to Mammalian Stress Granules. *J. Cell Biol.* **151**: 1257–1268.
- Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci* **38**.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005a). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**: 871–884.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005b). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**: 871–884.
- Kedersha, Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *J. Cell Biol.* **147**: 1431–1441.
- Kerényi, Z., Mérai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., Barta, E., Nagy, F., and Silhavy, D. (2008). Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **27**: 1585–1595.
- Kevei, Z. 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.
- Khalil, A.M. et al. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **106**: 11667–11672.
- Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S.F., Wheeler, J.R., and Parker, R. (2017). The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol. Cell* **68**: 808–820.e5.
- Kim, W.J., Back, S.H., Kim, V., Ryu, I., and Jang, S.K. (2005). Sequestration of TRAF2 into Stress Granules Interrupts Tumor Necrosis Factor Signaling under Stress Conditions. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 2450–2462.
- Kimball, S.R., Horetsky, R.L., Ron, D., Jefferson, L.S., and Harding, H.P. (2003). Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Physiol.* **284**: C273–C284.
- Klaus-Heisen, D., Nurisso, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Mbengue, M., Camut, S., Timmers, T., Pichereaux, C., Rossignol, M., Gadella, T.W.J., Imbert, A., Lefebvre, B., and Cullimore, J. V. (2011). Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *J. Biol. Chem.* **286**: 11202–11210.

- L. Rinn, J. and Chang Y, H. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*: 8–12.
- Laguerre, G., Nour, S.M., Drouin, P., Amarger, N., Sanjuan, J., and Macheret, V. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**: 981–993.
- Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., De Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J.* **79**: 757–768.
- Lambermon, M.H., Simpson, G.G., Wieczorek Kirk, D. a, Hemmings-Mieszczak, M., Klahre, U., and Filipowicz, W. (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *Embo* **19**: 1638–1649.
- Landy, A. (1989). rights reserved DYNi \ MIC , STRUCTURAL , AND SITE-SPECIFIC RECOMBINATION. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 913–949.
- Lauria, M. and Rossi, V. (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1809**: 369–378.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 204–220.
- Le, S.Y. and Maizel, J. V. (1997). A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 362–369.
- De Leeuw, F., Zhang, T., Wauquier, C., Huez, G., Kruys, V., and Gueydan, C. (2007). The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp. Cell Res.* **313**: 4130–4144.
- Lei, L. et al. (2015). Ribosome profiling reveals dynamic translational landscape in maize seedlings under drought stress. *Plant J.* **84**: 1206–1208.
- Leigh, G.J. (2004). Chapter 2 HABER-BOSCH AND OTHER INDUSTRIAL PROCESSES.: 33–54.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781–784.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhou, B., Kulikova, O., Journet, E., Ane, J.-M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C., and Debelle, F. (2004). A Putative Ca²⁺ and Calmodulin- Dependent Protein Kinase Required. *Science (80-)*. **303**: 1361–1364.
- Li, S. et al. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in arabidopsis. *Cell* **153**: 562–574.
- Li, S. (2015). The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signal. Behav.* **10**: 1–12.
- Li, Y. (2002). Partial reconstitution of human RNase P in HeLa cells between its RNA subunit with an affinity tag and the intact protein components. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3706–3711.
- Libault, M., Farmer, A., Joshi, T., Takahashi, K., Langley, R.J., Franklin, L.D., He, J., Xu, D., May, G., and Stacey, G. (2010). An integrated transcriptome atlas of the crop model Glycine max, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J.* **63**: 86–99.
- Licatalosi, D.D. and Darnell, R.B. (2010). Governing Biological Networks. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 75–87.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003). LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science (80-)*. **302**: 630–633.
- Limpens, E., Moling, S., Hooiveld, G., Pereira, P.A., Bisseling, T., Becker, J.D., and Küster, H. (2013). Cell- and Tissue-Specific Transcriptome Analyses of Medicago truncatula Root Nodules. *PLoS One* **8**.
- Lingner, J. and Cech, T.R. (2002). Purification of telomerase from Euplotes aediculatus: requirement of a primer 3' overhang. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 10712–10717.
- Liu, J., Rutten, L., Limpens, E., Molen, T. van der, Velzen, R. van, Chen, R., Chen, Y., Geurts, R., Kohlen, W., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2019). A Remote cis-Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in Medicago truncatula. *Plant Cell*.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *NIH Public Access* **7**.
- Liu, R., Li, X., Chen, W., and Du, J. (2018). Structure and mechanism of plant histone mark readers. *Sci. China Life Sci.* **61**: 170–177.
- Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Peñuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K., and VandenBosch, K.A. (2006). Transcript Analysis of Early Nodulation Events in Medicago truncatula. *Plant Physiol.* **140**: 221–234.
- Lorkovic, Z.J. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* **30**: 623–635.
- Lorković, Z.J. (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci.* **14**: 229–236.
- Lorkovic, Z.J., Kirk, D.A.W., and Klahre, U. (2000). RBP45 and RBP47 , two oligouridylate-specific hnRNP-like proteins interacting with poly (A)+ RNA in nuclei of plant cells. *Rna* **6**: 1610–1624.
- Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J., and Parniske, M. (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.
- Magee, P.N. and Barnes, J.M.** (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer* **10**: 114–122.
- Mamidi, S., Rossi, M., Moghaddam, S.M., Annam, D., Lee, R., Papa, R., and McClean, P.E.** (2013). Demographic factors shaped diversity in the two gene pools of wild common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Heredity* (Edinb). **110**: 267–276.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E.D.** (2007). *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiol.* **144**: 324–335.
- Martínez-Romero, E.** (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. *Plant Soil* **252**: 11–23.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J.** (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: Life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 843–854.
- Maunoury, N. et al.** (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**.
- Mazroui, R.** (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 3007–3017.
- Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M., Kaufman, R., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., and Pelletier, J.** (2006). Inhibition of Ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **17**: 4212–4219.
- Mazziotta, L., Reynoso, M.A., Aguilar, O.M., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E.** (2013). Transcriptional and functional variation of NF-YC1 in genetically diverse accessions of *Phaseolus vulgaris* during the symbiotic association with *Rhizobium etli*. *Plant Biol.* **15**: 808–818.
- Mchugh, C.A., Chen, C., Chow, A., and Guttman, M.** (2015). The Xist lncRNA directly interacts with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* **521**: 232–236.
- Mchugh, C.A., Russell, P., and Guttman, M.** (2014). Methods for comprehensive experimental identification of RNA-protein interactions.: 1–10.
- Meade, H.M. and Signer, E.R.** (1977). Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 2076–8.
- Merchante, C., Stepanova, A.N., and Alonso, J.M.** (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant J.* **90**: 628–653.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.-E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 5230–5235.
- Merret, R., Carpentier, M.-C., Favory, J.-J., Picart, C., Descombin, J., Bousquet-Antonelli, C., Tillard, P., Lejay, L., Deragon, J.-M., and Charny, Y.** (2017). Heat Shock Protein HSP101 Affects the Release of Ribosomal Protein mRNAs for Recovery after Heat Shock. *Plant Physiol.* **174**: 1216–1225.
- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. ting, Favory, J.J., Carpentier, M.C., Chaparro, C., Charny, Y. yung, Deragon, J.M., and Bousquet-Antonelli, C.** (2013). XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Rep.* **5**: 1279–1293.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D., and Seydoux, G.** (2008). 3' UTRs Are the Primary Regulators of Gene Expression in the *C. elegans* Germline. *Curr. Biol.* **18**: 1476–1482.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Loughon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R., and Ané, J.-M.** (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**: 912–21.
- Meteignier, L.V., El-Oirdi, M., Cohen, M., Barff, T., Matteau, D., Lucier, J.F., Rodrigue, S., Jacques, P.E., Yoshioka, K., and Moffett, P.** (2017). Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **68**: 2333–2344.
- Meyer, K., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C., and Jeffrey, S.** (2012). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons. *Cell* **149**: 1635–1646.
- Middleton, P.H. et al.** (2007). An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction. *Plant Cell Online* **19**: 1221–1234.
- Miri, M., Janakirama, P., Huebert, T., Ross, L., McDowell, T., Orosz, K., Markmann, K., and Szczygłowski, K.** (2019). Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytol.* **222**: 1523–1537.
- Missra, A., Ernest, B., Lohoff, T., Jia, Q., Satterlee, J., Ke, K., and von Arnim, A.G.** (2015). The Circadian Clock Modulates Global Daily Cycles of mRNA Ribosome Loading. *Plant Cell* **27**: 2582–2599.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D.** (1997). The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457–466.
- Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Coldwell, M.J., Jackson, R.J., and Willis, A.E.** (2003). The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol.*

- Cell **11**: 757–771.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., and Long, S.R.** (2004). From The Cover: A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 4701–4705.
- Mitra, R.M. and Long, S.R.** (2004). Plant and Bacterial Symbiotic Mutants Define Three Transcriptionally Distinct Stages in the Development of the. *Society* **134**: 595–604.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A.** (2006). Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**: 914–23.
- Mokas, S., Mills, J., Garreau, C., Fournier, M., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R., Pelletier, J., and Mazroui, R.** (2009). Uncoupling Stress Granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* **20**: 2673–2683.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F., and Gamas, P.** (2011). Transcription Reprogramming during Root Nodule Development in *Medicago truncatula*. *PLoS One* **6**.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**: 621–8.
- Motomura, K., Le, Q.T.N., Hamada, T., Kutsuna, N., Mano, S., Nishimura, M., and Watanabe, Y.** (2015). Diffuse decapping enzyme DCP2 accumulates in DCP1 foci under heat stress in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **56**: 107–115.
- Muhlrad, D. and Parker, R.** (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* **370**: 578–581.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., and Imbert, 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.
- Munusamy, P., Zolo, Y., Meteignier, L., and Moffett, P.** (2017). De novo computational identification of stress-related sequence motifs and microRNA target sites in untranslated regions of a plant transcriptome.: 1–14.
- Murakami, E. et al.** (2018). Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signalling in *Lotus japonicus*. *Elife* **7**: 1–21.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczygłowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* (80-.). **315**: 101–104.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-serres, J.** (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**.
- Nagamori, I., Cruickshank, V.A., and Sassone-Corsi, P.** (2011). Regulation of an RNA granule during spermatogenesis: acetylation of MVH in the chromatoid body of germ cells. *J. Cell Sci.* **124**: 4346–4355.
- Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S., and Anderson, P.** (2008). A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1224–1231.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A.** (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 119–144.
- Onomoto, K. et al.** (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One* **7**.
- Ovchinnikova, E. et al.** (2011). IPD3 Controls the Formation of Nitrogen-Fixing Symbiosomes in Pea and *Medicago* Spp. . *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**: 1333–1344.
- Pan, H., Stonoha-Arther, C., and Wang, D.** (2018). *Medicago* Plants Control Nodulation by Regulating Proteolysis of the Receptor-Like Kinase DMI2 . *Plant Physiol.* **177**: 792–802.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J.** (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**: 1413–1415.
- Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., and Fu, X.** (2013). Genome-wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing. *Mol. Cell* **50**: 223–235.
- Papa, R. and Gepts, P.** (2003). Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 239–250.
- Parker, R. and Sheth, U.** (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol. Cell* **25**: 635–646.
- Patel, G.P., Ma, S., and Bag, J.** (2005). The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* **33**: 7074–7089.
- Peltzer Meschini, E., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., Beker, M.P., Küster, H., Pühler, A., and Aguilar, O.M.** (2008). Host Genes Involved in Nodulation Preference in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)– *Rhizobium etli* Symbiosis Revealed by Suppressive Subtractive Hybridization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 459–468.
- Peng, Z. et al.** (2012). Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat. Biotechnol.* **30**: 253–260.
- Penmetsa, R.V. and Cook, D.R.** (1997). A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial

- Symbiont. Science (80-.). **275**.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180–201.
- Petre, B., Saunders, D.G.O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K. V., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S.** (2016). Heterologous expression screens in *Nicotiana benthamiana* identify a candidate effector of the wheat yellow rust pathogen that associates with processing bodies. *PLoS One* **11**: 1–16.
- Pislariu, C.I. 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., and Frugier, F.** (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **65**: 622–633.
- Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., and Genschik, P.** (2006). The Exoribonuclease XRN4 Is a Component of the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **18**: 3047–3057.
- Protter, D.S.W. and Parker, R.** (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* **26**: 668–679.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., and Sato, S.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria.: 585–592.
- Reineke, L.C., Kedersha, N., Langereis, M.A., van Kuppeveld, F.J.M., and Lloyd, R.E.** (2015). Stress Granules Regulate Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Activation through a Complex Containing G3BP1 and Caprin1. *MBio* **6**: 1–12.
- Reineke, L.C. and Lloyd, R.E.** (2015). The Stress Granule Protein G3BP1 Recruits Protein Kinase R To Promote Multiple Innate Immune Antiviral Responses. *J. Virol.* **89**: 2575–2589.
- Rendón-Anaya, M. et al.** (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biol.* **18**: 1–17.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., Bailey-Serres, J., Crespi, M., and Zanetti, M.E.** (2013a). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **73**: 289–301.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E.** (2013b). Insights into post-transcriptional regulation during legume-rhizobia symbiosis. *Plant Signal. Behav.* **8**.
- Ried, M.K., Antolín-Llovera, M., and Parniske, M.** (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *Elife* **3**: 1–17.
- Rinn, J. and Guttman, M.** (2014). RNA and dynamic nuclear organization: Long noncoding RNAs may function as organizing factors that shape the cell nucleus. *Science (80-.).* **345**: 1240–1241.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J., Squazzo, S., Xu, X., Brugman, S., and Chang, H.** (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Non-Coding RNAs. *Cell* **129**: 1311–1323.
- Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Villafañe, J., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E.** (2019). The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 Subunits of the Heterotrimeric NF-Y Transcription Factor Influence Strain Preference in the *Phaseolus vulgaris*–*Rhizobium etli* Symbiosis. *Front. Plant Sci.* **10**: 1–16.
- Rípodas, C., Via, V.D., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2013). Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* **68**: 81–89.
- Roudier, F., Fernandez, A.G., Fujita, M., Himmelsbach, R., Borner, G.H.H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T.I., Dupree, P., Wasteneys, G.O., and Benfey, P.N.** (2005). COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* **17**: 1749–1763.
- Roudier, F., Schindelman, G., DeSalle, R., and Benfey, P.N.** (2002). The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis. A new fellowship in expansion. *Plant Physiol.* **130**: 538–548.
- Rourke, O. et al.** (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics* **15**.
- Roux, B. 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.
- Rymarquis, L.A., Souret, F.F., and Green, P.J.** (2011). Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. *Rna* **17**: 501–511.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., and Duc, G.** (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ-ray mutagenesis. *Plant Sci.* **111**: 63–71.
- Saha, S., Dutta, A., Bhattacharya, A., and DasGupta, M.** (2014). Intracellular Catalytic Domain of Symbiosis Receptor Kinase Hyperactivates Spontaneous Nodulation in Absence of Rhizobia. *Plant Physiol.* **166**: 1699–1708.
- Saito, K. et al.** (2007). NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Online* **19**: 610–624.
- Schallus, T., Jaeckh, C., Feher, K., Palma, A., and Muhle-Goll, C.** (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.
- Schmitz-Linneweber, C.** (2005). RNA Immunoprecipitation and Microarray Analysis Show a Chloroplast

- Pentatricopeptide Repeat Protein to Be Associated with the 5' Region of mRNAs Whose Translation It Activates. *Plant Cell Online* **17**: 2791–2804.
- Schmutz, J. et al.** (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet.* **46**: 707–713.
- Sidrauski, C., McGeachy, A.M., Ingolia, N.T., and Walter, P.** (2015). The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2?? phosphorylation on translation and stress granule assembly. *Elife* **4**: 1–16.
- Simms, E.L. and Lee Taylor, D.** (2002). Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integr. Comp. Biol.* **42**: 369–380.
- Singh, S.P., Gepts, P., and Debouck, D.G.** (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* **45**: 379–396.
- Siwaszek, A., Ukleja, M., and Dziembowski, A.** (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biol.* **11**: 1122–1139.
- Smil, V.** (1999). Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* **13**: 647–662.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T.** (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.* **145**: 183–91.
- Soma, F., Mogami, J., Yoshida, T., Abekura, M., Takahashi, F., Kidokoro, S., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017). ABA-unresponsive SnRK2 protein kinases regulate mRNA decay under osmotic stress in plants. *Nat. Plants* **3**: 1–8.
- Sorenson, R. and Bailey-Serres, J.** (2014a). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 2373–2378.
- Sorenson, R. and Bailey-Serres, J.** (2014b). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 2373–2378.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J.** (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell* **15**: 173–183.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M.** (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **9**.
- Spector, D.L.** (2006). SnapShot: Cellular Bodies. *Cell* **127**: 10–11.
- Standart, N. and Weil, D.** (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends Genet.* **34**: 612–626.
- Stougaard, J., Schauser, L., Roussis, A., and Stiller, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**: 191–195.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2002). Nature00841.Pdf. *Nature* **417**: 959–962.
- Sultan, M. et al.** (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* (80-.). **321**: 956–960.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P., and Mysore, K.S.** (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **54**: 335–347.
- Takahara, T. and Maeda, T.** (2012). Transient Sequestration of TORC1 into Stress Granules during Heat Stress. *Mol. Cell* **47**: 242–252.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R.** (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* **11**: 371–382.
- Thedieck, K. et al.** (2013). Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells. *Cell* **154**: 859–874.
- Tilman, D., Cassman, K., Matson, P., Naylor, R., and Polasky, S.** (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.
- Timmers, A.C., Auriac, M.C., and Truchet, G.** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**: 3617–28.
- Tirichine, L., James, E.K., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2007a). 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, L.H., Radutoiu, S., Albrechtsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J.** (2007b). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* (80-.). **315**: 104–107.
- Tohme, J., Gonzalez, D.O., Beebe, S., and Duque, M.C.** (1996). PLANT GENETIC RESOURCES Analysis of Gene Pools of a Wild Bean Core Collection. *Crop Sci.* **36**: 1375–1384.
- Trevisan, L.** (2004). Some Applications of Coding Theory in Computational Complexity. **23**: 3992–4012.
- Trieu, A.T. and Harrison, M.J.** (1996). Rapid transformation of *Medicago truncatula*: Regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* **16**: 6–11.
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C.H., Subtelny, A.O., Koppstein, D., Bell, G.W., Sive, H., and Bartel, D.P.** (2012). Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome Res.* **22**: 2054–2066.
- Vance, C.P., Graham, P.H., and Allan, D.L.** (2000). F.O. Pedrosa et al. (eds.), Nitrogen Fixation: From Molecules to

- Crop Productivity, 509–514. © 2000 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.: 2000.
- Velasquez, V.L.B. and Gepts, P.** (2008). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* **37**: 256–263.
- Venkateshwaran, M., Jayaraman, D., Chabaud, M., Genre, A., Balloon, A.J., Maeda, J., Forshey, K., den Os, D., Kwiecien, N.W., Coon, J.J., Barker, D.G., and Ané, J.-M.** (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, M.L., de Carvalho-Niebel, F., and Oldroyd, G.E.D.** (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root. *Plant Cell* **27**: 3410–3424.
- Vernie, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.-P., Rogers, C., Oldroyd, G., Frugier, F., Niebel, A., and Gamas, P.** (2008). EFD Is an ERF Transcription Factor Involved in the Control of Nodule Number and Differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Online* **20**: 2696–2713.
- Vlasova, A. et al.** (2016). Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biol.* **17**: 17–32.
- Voinnet, O.** (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**: 669–87.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**: 949–956.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B.** (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**: 470–6.
- Wang, T. and Abrams, G.D.** (2014). Current concepts in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. *Minerva Ortop. e Traumatol.* **65**: 87–102.
- Weber, C., Nover, L., and Fauth, M.** (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* **56**: 517–530.
- Wilczynska, A.** (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* **118**: 981–992.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T.** (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**: 3517–3528.
- Xu, G., Greene, G.H., Yoo, H., Liu, L., Marqués, J., Motley, J., and Dong, X.** (2017). Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature* **545**: 487–490.
- Xu, J. and Chua, N.-H.** (2009). Arabidopsis Decapping 5 Is Required for mRNA Decapping, P-Body Formation, and Translational Repression during Postembryonic Development. *Plant Cell* **21**: 3270–3279.
- Xu, J. and Chua, N.H.** (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J.* **31**: 1975–1984.
- Xu, J. and Chua, N.H.** (2011). Processing bodies and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 88–93.
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H.** (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE Form a Decapping Complex Required for Postembryonic Development. *Plant Cell Online* **18**: 3386–3398.
- Xue, Y., Zhou, Y., Wu, T., Ji, X., Kwon, Y., and Zhang, Y.** (2009). Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol. Cell* **36**: 996–1006.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Amor, B., Ben, Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., and Gamas, P.** (2004). Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. *Plant Physiol.* **136**.
- Yano, K. et al.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 20540–20545.
- Yeo, G.W., Coufal, N., Liang, T., Peng, G., Fu, X., and Gage, F.** (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**: 130–137.
- Young, N.D., Debellé, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Steven, B., Udvardi, M.K., Bedito, V.A., and Mayer, K.F.X.** (2012). Europe PMC Funders Group The *Medicago* Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses. *Nature* **480**: 520–524.
- Yu, X., Willmann, M.R., Anderson, S.J., and Gregory, B.D.** (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.
- Zanetti, E., Chang, I., Gong, F., Galbraith, D.W., and Bailey-serres, J.** (2005). Immunopurification of Polyribosomal Complexes of Arabidopsis for Global Analysis of Gene Expression. *Plant Physiol.* **138**: 624–635.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M.** (2010). A C Subunit of the Plant Nuclear Factor NF-Y Required for Rhizobial Infection and Nodule Development Affects Partner Selection in the Common Bean–*Rhizobium etli* Symbiosis. *Plant Cell* **22**: 4142–4157.
- Zhang, C., Frias, M., Mele, A., Ruggiu, M., and Darnell, R.** (2010). Integrative modeling defines the Nova splicing-regulatory network and its combinatorial controls. *Science* (80-.). **329**: 439–443.
- Zhang, L., Liu, X., Gaikwad, K., Kou, X., Wang, F., Tian, X., Xin, M., Ni, Z., Sun, Q., Peng, H., and Vierling, E.** (2017). Mutations in eIF5B Confer Thermosensitive and Pleiotropic Phenotypes via Translation Defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **29**: 1952–1969.

- Zhang, X.O., Yin, Q.F., Chen, L.L., and Yang, L.** (2014). Gene expression profiling of non-polyadenylated RNA-seq across species. *Genomics Data* **2**: 237–241.
- Zhao, J., Sun, B., Erwin, J., Song, J., and Lee, J.** (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X-chromosome. *Science* (80-.). **322**: 750–756.
- Zhong Wang, M.G. and Snyder, M.** (2001). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics Zhong. *Bioinforma. A Pract. Guid. to Anal. Genes Proteins* **10**: 57–63.
- Zumft, W.G. and Mortenson, L.E.** (1975). The nitrogen-fixing complex of bacteria. *BBA Rev. Bioenerg.* **416**: 1–52.

Anexo I

Secuenciaciones de las construcciones utilizadas para la transformación de raíces de *M. truncatula*

35S:RBP47-FH

TTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAA
GC
AGGCTCCGCGCGCCGCCCTT**CACC**ATGCAACCAGGAGGACCAGGTATGCCACCACCCAACCTGGCTCAACAATTTC
TC
AACAAGTACAACAGCAACATCAACAACAACCACCTACATGATGATGCATCCTCCTCAGCCTCAACCTCAACCACAAA
CT
CAACCTCCTCAGATGTGGGCCCTTAACGCCAGCCTCCTCAACAATCGGCGGTTCTCCTCCTTCCAGCGCCGATGAA
GT
CAAACTCTCTGGATCGGTGATTTGCAATATTGGATGGACGAGAATTATCTTTATAACTGTTTCTCTCACACCGGCGA
GG
TTGGATCTGTTAAAGTTATTCGTAATAAGCAGACTAATCAATCTGAAGGTTATGGGTTTCTTGAGTTTATTAGCCGTG
CT
GGTGCTGAGAGAGTACTTCAAACATTTAATGGCACCATTATGCCAAATGGTGGCCAGAATTCAGATTGAACTGGGCA
AC
TTTTAGTTCTGGTGAGAAGCGTCATGATGATTCTCCGACTACACCATATTTGTTGGTGACTTGGCTGCTGATGTTTC
TG
ATCATCATTTGACGGAAGTGTTTAGAACTCGGTATAATTAGTTAAGGGTGCCAAAGTTGTAATCGACAGGACCACTG
GT
AGGACAAAAGGTTATGGTTTTGTTAGGTTTCTGATGAGAGTGAACAAATGAGGGCTATGACTGAAATGCAAGGGGTT
CT
TTGTTCCACAAGACCCATGCGTATTGGACCAGCCTCTAACAAAAACCTTGGCACACAGACTTCAAAAGCTTCTTATCA
GA
ATCCACAAGGAGGGGCACAGAACGAGAATGATCCAAATAATACAACCATTTTGTGGCAATTTGGATCCTAATGTCA
CA
GATGAACATTTGAAACAAGTTTTTACCCAGTATGGTGAACGGTTCATGTTAAGATTCCATCAGGCAAGAGATGTGGG
TT
TGTCCAATTTGCAGACAGGAGTTCTGCTGAGGAGGCACCTACGGGTTTTAAATGGTACACTTCTAGGTGGTCAAAATGT
CC
GGCTTTTCATGGGGCCGAAGCCCGGCAACAAGCAGACTCAACAAGATCCAAACCAGTGAATGGTAGTAGCAGTTACT
TC
GGCGGTTATGCCCAAGGTTATGAAAATTATGCTTATGCCCTCCTGCTGGACAAGACCCAAATATGTATGGCAGTTAT
CC
GGCGGGGTATGCAAGTTACCAACCTCCTCAGCAGCAACAGCAATTAGGATATAGT**AAGGGTGGGCGCGCCGACCAGC**
TT
TCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAAATA
AA
ATCATTATTTCCATCCAGC

■ AttL1, AttL2 ■ RBP47- CDS ■ CACC

35S:DCP1-FH

GACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAG
CTCCGCGCGCGCCGCCCTT**CACC**ATGTCTCAGAACGGGAAATTGATGCCGAATCTCGACCAACAAAGCACTAAGCTTCT
CAATCTCACTGTTCTCCAACGAATTGACCTTTTCGTTGAGGAAATCTCATTACTGCTGCTCATGTTACGTTCTATGA
GTTTAACATCGATCTTAGCCAATGGAGTCGTAAGGATGTTGAAGGATCTCTCTTTGTTGTTAAGAGAAATACTCAACC
AAGATTTCAATTTTATTTGATGAATCGTCGGAATACTGAAAATTTGGTGGAACCTCCTGGGGGATTTTCAGTATGA
AATTCAGGTTCCATATCTATTGTATAGAAATGCTGCTCAAGAAGTGAATGGTATTTGGTTCTATAATGCTCGGAATG
TGAAGAGGTTGCAATCTTTTAGCAGGATTCTTAATGCATATGCCAAGGTGCCTCCAAAGTTAAAGGTCTCTTCTAC
AAAGAGTGAATTTGAGGAACTGGAAGCAGTACCAACTATGGCAGTCATGGATGGTCTCTTGGCCATCATCATCAAT
TACTTCCATGTAGCTGATGTTCTGATGATCCATCCTTTATAAATTTCTTCAGTGCGGCTATGGGTATCGGGAATAC
TTCAATGCTCCGATCACCGGACAACCTTATCAGTCTTCTGCTACAATTTCTTCTTCTGGGCCAACTCATGCTGCTAC
ACCTGTTGTGCCACTGCCAACCTTGCAGATACCATCTCTTCCAACATCTACTCCGTTTACACCCAGCATGATGCTCC
TGAGTCCATCAACAGCAGCAGCCAAAGCCCAAATCTTGTGAAGCCTTCTTTTTTTGTTCTCCCTTTCTTCTGCAAGC
AATGATGATGCCCCCTGTGCTTCATCCATACCTACTGCCCTCCACTTCATCCTACTGGTACTGTACAACGACCTTA
TGGTACTCCAATGCTACAGCCATTTCCACCTCCAACCTCCACCACCTTCACTTGCTCCTGTTTCTTCTCCCTTCCAAA
CCCAGCTATTTCTAGAGAAAAGGTTTCGAGATGCTCTGCTGGTCTGCTTCAGGACAATCAATTCATTGATATGTTTAA

TAAAGCGCTGCTGAATGCTCATCAATCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAG
AAAGCATTTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTTC

AttL1, AttL2 DCP1- CDS CACC

35S:RBP47-rfp

TTGGTCACCTTCAGCTTGGCGGTCTGGGTGCCCTCGTAGGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAACTCGTGG
CC
GTTACGGGAGCCCTCCATGCGCACCTTGAAGCGCATGAACTCCTTGATGACGTCTCGGAGGAGGCCATTGATATCAC
CA
CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCGCCCCACCTTACTATATCCTAATTGCTGTTGCTGCTGAGGAGGTGGTAAC
TT
GCATACCCCGCCGATAACTGCCATACATATTTGGGTCTTGTCCAGCAGGAGGGGCATAAGCATAATTTTCATAACCT
TG
GGCATAACCGCCGAAGTAACTGCTACTACCATTCCACTGGTTTGATCTTGTGAGTCTGCTTGTGGCGGGCTTCG
GC
CCCATGAAAGCCGGACATTTTGACCACCTAGAAGTGTACCATTTAAACCCGTAGTGCTCCTCAGCAGAACTCCTGT
CT
GCAAATTGGACAAACCCACATCTCTTGCCTGATGGAATCTTAACATGAACCAGTTCACCATACTGGGTAAAACTTGT
TT
CAAATGTTTATCTGTGACATTAGGATCCAAATTGCCAACAAAAATGGTTGTATTATTTGGATCATTCTCGTTCTGTGC
CC
CTCCTTGTGGATTCTGATAAGAAGCTTTTGAAGTCTGTGTGCCAAGTTTTTGTAGAGGCTGGTCCAATACGCATGG
GT
CTTGTGGAACAAAGAACCCTTGCATTTTCAGTCATAGCCCTCATTTGTTCACTCTCATCAGCAAACCTAACAAAACCA
TA
ACCTTTTGTCTTACCAGTGGTCTGTGATTACAACCTTTGGCACCTTAACTGAATTATACCGAGTTCTAAACACTTC
CG
TCAAATGATGATCAGAAACATCAGCAGCCAAGTCACCAACAAATATGGTGTAGTCCGAGAAATCATCATGACGCTTCT
CA
CCAGAACTAAAAGTTGCCAGTTCAATCTGAAATCTTGCCACCATTTTGGCATAATGGTGCCATTAAATGTTTGAAGT
AC
TCTCTCAGCACCAGCACGGCTAATAAACTCAAGAAACCCATAACCTTCAGATTGATTAGTCTGCTTATTACGAATAAC
TT
TAACAGATCCAACCTCGCCGGTGTGAGAGAAACAGTTATAAAGATAATTCTCGTCCATCCAATATTGCAAATCACCGA
TC
CAGAGAGTTTGGACTTCATCGGCGCTGGAAGGAGGAGGAACCGCCGATTGTTGAGGAGGCTGGGCGTTAGGGGCCAC
AT
CTGAGGAGGTTGAGTTTGTGGTTGAGGTTGAGGCTGAGGAGGATGCATCATCATGTAGGGTGGTTGTTGTTGATGTTG
CT
GTTGTACT

RBP47- CDS rfp

35S:DCP1-yfp

TTCTCAATCTCACTGTTCTCCAACGAATTGACCCCTTCGTTGAGGAAATTCCTATTACTGCTGCTCATGTTACGTTCT
AT
GAGTTTAAATCGATCTTAGCCAATGGAGTCGTAAGGATGTTGAAGGATCTCTCTTTGTTGTTAAGAGAAATACTCAA
CC
AAGATTTCACTTTATTGTGATGAATCGTCGGAATACTGAAAATTTGGTGAAAACCTCCTGGGGGATTTTCAGTATGA
AA
TTCAGGTTCCATATCTATTGTATAGAAATGCTGCTCAAGAAGTGAATGGTATTGTTCTATAATGCTCGCGAATGTG
AA
GAGGTTGCAAATCTTTTAGCAGGGTTCTTAATGCATATGCCAAGGTGCCTCCAAAGTTAAAGGTCTCTTCTACAAAG
AG
TGAATTTGAGGAAGTGAAGCAGTACCAACTATGGCAGTCATGGATGGTCCTCTTGAGCCATCATCATCAATTACTTC
CA
ATGTAGCTGATGTTCTGATGATCCATCCTTTATAAATTTCTTCAGTGCGGCTATGGGTATCGGGAATACTTCAAATG
CT

CCGATCACCGGACAACCTTATCAGTCTTCTGCTACAATTTCTTCTTCTGGGCCAACTCATGCTGCTACACCTGTTGTG
 CC
 ACTGCCAACCTTGCAGATACCATCTCTTCCAACATCTACTCCGTTTACACCCCAGCATGATGCTCCTGAGTCCATCAA
 CA
 GCAGCAGCCAAGCCACAAATCTTGTGAAGCCTTCTTTTTTGTTCCTCCCCTTCTTCTGCAGCAATGATGATGCCCC
 CT
 GAGTCTTCATCCATACCTACTGCCCCCTCCACTTCATCCTACTGGTACTGTACAACGACCTTATGGTACTCCAATGCTA
 CA
 GCCATTTCCACCTCCAACCTCCACCACCTTCACTTGCTCCTGTTTCTTCTCCCCTTCCAAACCCAGCTATTTCTAGAGA
 AA
 AGGTTTCGAGAGGCTCTGCTGGTGCTCGTTCAGGACAATCAATTCATTGATATGGTTTATAAAGCGCTGCTGAATGCTC
 AT
 CAATCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATATCAATGGTGAGCAAGGGTGAGGAGCTG
 TC
 ACC

DCP1- CDS yfp

Anexo II

Tabla A. Genes de *M. truncatula* que presentan un motivo conservado rico en bases pirimídicas, en su extremo 5'- UTR. El análisis se realizó sobre las secuencias de los 5'-UTR de los genes *Down* regulados en sus niveles de traducción, con la plataforma MEME (Bailey et al., 2006). Se muestra el identificador de los genes, la secuencia identificada, la posición y el valor estadístico. Archivo: Anexo II, Tabla A- Motivo Y.

Tabla B. Genes de *M. truncatula* que presentan un motivo conservado rico en bases púricas, en su extremo 5'- UTR. El análisis se realizó sobre las secuencias de los 5'-UTR de los genes *Up* regulados en sus niveles de traducción, con la plataforma MEME (Bailey et al., 2006). Se muestra el identificador de los genes, la secuencia identificada, la posición y el valor estadístico. Archivo: Anexo II, Tabla B- Motivo R.

Tabla C. Secuencias regulatorias encontradas en los extremos no traducidos de los mRNA de genes implicados en la vía del Nod Factor. Se utilizó la base de datos de UTRdb (Grillo et al., 2009) para la búsqueda de secuencias involucradas en la regulación de la traducción de los mRNA. Se analizaron ambos extremos no traducidos. Se presentan los motivos y su posición en cada secuencia. Archivo: Anexo II, Tabla C- UScan.

Tabla D. Genes de la vía del Nod Factor en *M. truncatula* que presentan un motivo conservado rico en bases púricas, en su extremo 5'- UTR. Se realizó la búsqueda del motivo conservado encontrado en mRNA de genes *Up* regulados (**Tabla B, Fig. 31 B**) sobre los mRNA de los genes involucrados en la vía del NF. Se utilizó el algoritmo FIMO (Grant et al., 2011). Se muestra el nombre de los genes, la secuencia buscada, las posiciones de inicio y finalización del motivo sobre la extensión de cada mRNA y su valor estadístico. Archivo: Anexo II, Tabla D- FIMO- 5-UTR-Up- Genes Nod.

Anexo III

Tabla A. Genes expresados diferencialmente en presencia de rizobios. Se muestran los Identificadores de cada gen en las distintas anotaciones genómicas de ambos genomas de poroto. Archivo: Anexo III- Tabla A.

Tabla B. Lista de elementos regulatorios para los promotores provenientes de cada uno de los grupos (*4 cepas* y *Cepas Alfa*). Archivo: Anexo III- Tabla B.

Tabla C. Secuencias de los 5'- y 3'- UTR, y de las regiones codificantes (CDS) de los genes diferenciales, a partir de los transcritos de la variedad mesoamericana. Archivo: Anexo III- Tabla C

Tabla D. Lista de genes que contienen el motivo 5- 4C. Archivo: Anexo III- Tabla D

Tabla E. Lista de genes que contienen el motivo 3- 4C- 1. Archivo: Anexo III- Tabla E

Tabla F. Lista de genes que contienen el motivo 3- 4C- 2. Archivo: Anexo III- Tabla F

Tabla G. Lista de genes que contienen el motivo 5- α Up. Archivo: Anexo III- Tabla G

Tabla H. Lista de genes que contienen el motivo 3- α Down. Archivo: Anexo III- Tabla

H