

Caracterización fisiológica y molecular de la interacción Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli

Tesis Doctoral 2010

Lic. María Pía Beker

Director: Dr. O. Mario Aguilar

Codirector: Flavio A. Blanco



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

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, bajo la dirección del Dr. O. Mario Aguilar y la codirección del Dr. Flavio A. Blanco

A mi familia

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Exactas, por brindar el espacio físico, equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET, por la concesión de becas que me respaldaron económicamente.

Mi agradecimiento:

A mi Director, Dr. O. Mario Aguilar, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio R4, y dirigirme en forma crítica durante el transcurso de todos estos años, por brindar su estímulo al trabajo continuamente.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Flavio Blanco, que aceptó la codirección, y de igual forma a la Dra. Eugenia Zanetti, que me brindaron todo su apoyo desde mi incursión en el laboratorio, y por sus valiosos consejos, aportando una visión crítica y constructiva en la evolución de mi trabajo.

Al Dr. Gabriel Favelukes, que en mis comienzos en el laboratorio, me alentó a continuar con el trabajo, por su calidad científica y valiosas charlas al discutir más que los resultados que obtenía en la mesada.

A todos mis compañeros de laboratorio, presentes y que han pasado por R4. A Mauricio, Ana, Marina, Virginia, Lucía, Carolina, y a los que compartieron tiempo de trabajo, Eugenita, Nati, Kari, Eitel, Carolina E., Verónica.

A Rubén y Kati, por la cálida bienvenida de todos los días al IBBM,

A los vecinos del laboratorio, miembros del IBBM, por estar dispuestos a tender una mano y prestar reactivos y uso de aparatos.

Al laboratorio de Microbiología de la facultad de Sevilla, a cargo del Dr. M. Megías, por permitirme realizar una estancia dentro de su grupo de investigación.

A mis amigos, por estar siempre.

Y a mi familia, porque siempre van a estar conmigo, cuando más los necesite, como en momentos como este, apoyándome en todo lo que haga.

En fin, es innumerable la cantidad de gente que brindó su apoyo a lo largo de todos estos años,

Simplemente, a todos **¡MUCHAS GRACIAS!**

Índice General

Introducción	1-26
1. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).....	1
2. Importancia de la FBN.....	2
3. La asociación simbiótica fijadora de N ₂ entre leguminosas y rizobios.....	3
4. Evolución de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	4
5. Diversidad de plantas hospedadoras y rizobios.....	5
6. Etapas de la infección y nodulación.....	6
7. Primer contacto entre simbioses: flavonoides y factores Nod.....	7
8. Factores Nod, lipoquitoligosacáridos producidos por los rizobios	7
9. Especificidad de asociación simbiótica.....	9
10. Estructura de los factores Nod sintetizados por microsimbiontes de poroto.....	10
11. Polisacáridos y componentes de superficie: otros componentes de la bacteria requeridos para el proceso de infección y nodulación.....	12
12. Respuestas de la planta a los NF	12
13. Cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas.....	12
14. Genes del hospedador requeridos en la simbiosis.....	15
15. Expresión de nodulinas o genes marcadores de nodulación.....	19
13. Rol de las hormonas en la organogénesis del nódulo.....	20
14. Etapas tardías de la infección: el proceso de diferenciación.....	21
15. La asociación simbiótica entre poroto (<i>P. vulgaris</i>) y rizobios.....	23
16. Diversificación del cultivo de poroto.....	23
17. Importancia socioeconómica del cultivo de poroto.....	23
18. Coevolución del poroto en los centros de diversificación.....	24
19. Genes de poroto expresados específicamente por la infección con cepas del mismo centro de diversificación.	25
Objetivos	27
Materiales y Métodos	28-59
1. Medios de cultivo y soluciones.....	28
1.1. Medios de Cultivo.....	28
1.1.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	28
1.1.3. Medios de cultivo para rizobios.....	29
1.1.4. Medios de cultivo para levaduras.....	29
1.2. Soluciones empleadas.....	30
1.2.1. Antibióticos.....	30
1.2.2. Medio mineral para riego de plantas.....	30
1.2.3. Solución para transformación de levaduras: 10X LiAcTE.....	30
2. Material Biológico.....	31
2.1. Cepas bacterianas empleadas.....	31
2.1.1. Cepas de <i>Rhizobium etli</i> utilizadas.....	31

2.1.2. Otras cepas de <i>Rhizobium</i> empleadas.....	31
2.1.3. Cepas usadas para clonado y propagación de plásmidos.....	32
2.1.3.a. Plásmidos usados.....	33
2.2. Material vegetal.....	33
3. Condiciones de cultivo de poroto.....	33
3.1. Esterilización y germinación de las semillas.....	33
3.2. Crecimiento.....	34
4. Tratamiento del material vegetal y ensayos de inoculación con rizobios.....	34
4.1. Inoculación de plantas de poroto con rizobios.....	34
4.2. Cinéticas de nodulación.....	34
4.3. Determinación de peso seco.....	34
4.3. Determinación del tamaño de los nódulos.....	35
4.5. Cosecha de distintos órganos de plantas de poroto.....	35
4.6. Aplicación de hormonas a raíces de poroto.....	35
4.7. Inoculación con rizobios defectivos en componentes de superficie.....	36
4.8. Ensayos de competencia.....	36
5. Generación de plantas compuestas de poroto.....	36
5.1. Crecimiento de <i>A. rhizogenes</i> K599.....	36
5.2. Transformación de poroto.....	36
6. Aislamiento de rizobios de nódulos.....	37
6.1. Esterilización superficial de nódulos.....	37
6.2. Aislamiento de rizobios.....	37
6.3. Preparación de DNA de rizobios para su uso en reacciones de PCR.....	37
6.4. Amplificación por PCR del gen <i>nodC</i> de <i>R. etli</i>	38
6.5. Análisis del perfil de restricción del fragmento amplificado por PCR del gen <i>nodC</i>	38
6.6. Amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos con los <i>primers</i> REP.....	38
7. Transformación de <i>Rhizobium etli</i> y <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	38
7.1. Conjugación triparental.....	39
7.2. Preparación de rizobios electrocompetentes.....	39
7.3. Preparación de electrocompetentes de <i>A. rhizogenes</i>	39
7.4. Transformación por “ <i>Freeze Thaw Method</i> ”.....	40
8. Preparación de células competentes de transformación de <i>E. coli</i> DH5α.....	40
8.1. Preparación de células competentes químicas.....	40
8.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α con DNA plasmídico.....	40
9. Transformación de levaduras.....	41
10. Preparación de DNA plasmídico.....	41
10.1. Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	41
10.2. Preparación de DNA plasmídico de <i>A. rhizogenes</i>	42
10.3. Preparación de DNA plasmídico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42

11. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.....	43
12. Medición de la concentración de DNA y RNA.....	44
13. Clonado molecular.....	44
13.1. Clonado en TOPO-TA.....	44
13.2. Clonado en pENTR/D-TOPO.....	44
13.3. Recombinación sitio específica mediante el sistema <i>Gateway</i>	45
14. Tratamiento enzimático del DNA.....	45
14.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	45
14.2. Ligaciones.....	45
15. Extracción de RNA total de tejido vegetal.....	45
15.1. Extracción con TRIZOL.....	45
15.2. Tratamiento del RNA con DNAsa.....	46
15.3. Síntesis de cDNA.....	46
16. Diseño de oligonucleótidos.....	46
16.1. Lista de oligonucleótidos usados.....	47
17. PCR cuantitativa en tiempo real (<i>qRT-PCR</i>).....	48
18. Análisis de secuencias de DNA.....	49
19. Observaciones microscópicas.....	50
19.1. Microscopia convencional.....	50
19.2. Microscopia confocal.....	50
20. <i>Screening</i> de doble híbrido en levadura.....	50
20.1. Clonado de <i>PvGGA1</i> en pGBKT7.....	51
20.2. Principales características de los vectores usados en el <i>screening</i>	53
20.3. Principales características de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	54
20.4. <i>Screening</i>	54
21. Obtención del marco abierto de lectura de <i>PvGGA1</i>.....	55
22. Construcciones plasmídicas para los ensayos de silenciamiento génico, localización celular y sobreexpresión.....	56
22.1. Silenciamiento de <i>PvRHS24-17</i> mediante RNAi.....	56
22.2. Localización subcelular de <i>PvGGA1</i>	57
22.3. Sobreexpresión de de <i>PvGGA1</i>	58
23. Análisis de LCOs mediante TLC y HPLC-MSMS.....	58
23.1. Cromatografía en capa delgada de LCOs.....	58
23.2. Análisis estructural de los LCOs.....	59

Capítulo 1: Caracterización de aspectos fisiológicos de la simbiosis implicadas en el reconocimiento específico entre cultivares y linajes de rizobio.....60-79

1. Patrón temporal de nodulación.....	61
2. Patrón temporal de formación de hilos de infección.....	63
3. Evaluación de la acumulación de materia seca en plantas como indicador de la eficiencia simbiótica.....	66
4. Evaluación del tamaño del nódulo formado por las variedades Nag12 y Alubia en simbiosis con cepas simpátricas y alopátricas.....	68
5. Estudio de la expresión de genes marcadores de nodulación en el contexto de la interacción var. poroto x linaje rizobio.....	69
Discusión de resultados y conclusiones.....	75

Capítulo 2: Caracterización química del factor de nodulación sintetizado por cepas de *R. etli* representativas de los centros de diversificación del poroto.....80-95

1. Análisis por Cromatografía en Capa Delgada.....	80
2. Determinación de la estructura de los LCOs mediante HPLC-MSMS.....	83
3. Estudio del gen <i>noIL</i> en cepas de <i>R. etli</i> : cepa 55N1, un caso particular.....	86
4. Investigación del efecto de la acetilación del fucosil en los LCOs sintetizados por <i>R. etli</i> sobre la competencia por la nodulación de <i>P. vulgaris</i>	89
5. Análisis de la expresión de genes de <i>P. vulgaris</i> var. Nag12 en raíces inoculadas con una cepa de <i>R. etli</i> mutante en el gen <i>noIL</i>	92
Discusión de resultados y conclusiones.....	94

Capítulo 3: Análisis de genes de *P. vulgaris* expresados diferencialmente en respuesta a cepas de *R. etli*.....96-136

1. Caracterización de los genes diferenciales mediante análisis filogenético y de secuencia.....	96
2. Análisis de la expresión de los clones diferenciales seleccionados en raíces de la variedad Mesoamericana Nag12.....	101
3. Análisis de la expresión de los clones diferenciales seleccionados en raíces de la variedad Andina Alubia.....	102
4. Estudios de expresión de <i>PvGGA1</i>	103
5. Análisis funcional mediante genética reversa.....	108
6. Efecto de la reducción de transcritos de <i>PvGGA1</i> en la simbiosis.....	110
7. Efecto de la sobreexpresión de <i>PvGGA1</i> en la simbiosis.....	112
8. Localización subcelular de <i>PvGGA1</i>	117
9. Proteínas que interactúan con el producto del gen <i>PvGGA1</i> en el sistema de doble híbrido de levadura	118
10. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de proteínas que interaccionan con <i>PvGGA1</i>	121
Discusión de resultados y conclusiones.....	124

Material suplementario 140-141

Bibliografía 142-176

Abreviaturas y siglas

aa	Aminoácidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
AIA	Ácido Indol Acético
ANOVA	Análisis de varianza
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BT	Bacteroide
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cm	Cloranfenicol
DO	Densidad óptica
dpi	Dias post inoculación
DsRED	<i>Red fluorescent protein</i>
ENOD	Nodulinas tempranas
EPS	Exopolisacárido
EST	Expressed sequence tag
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GlcNAc	N-acetil glucosamina
hpi	Horas post inoculación
HR	Respuesta hipersensible
IT	Hilo de infección
JÁ	Ácido jasmónico
Kb	Kilobases
Km	Kanamicina
KPS	Polisacáridos capsulares
LB	Medio Luria Bertani
LCOs	Lipoquitoligosacáridos
LPS	Lipopolisacárido
Min	Minuto
NF	<i>Nod factor</i>
ON	<i>Over night</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
p/v	Peso en volúmen
pb	Pares de bases
PBM	Membrana peribacteroidal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
PM	Peso molecular
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RNS	<i>Root nodule symbiosis</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida

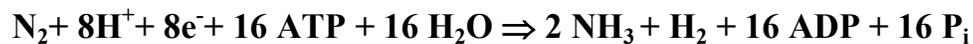
SB	Simbiosoma
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TC	Secuencia consenso tentativa
TY	<i>Tryptone Yeast</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
Wt	Tipo salvaje
°C	Grados Celsius

Introducción

Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno molecular (N₂) es el componente más abundante de la atmósfera, donde representa el 78% del aire. Forma parte de varias moléculas esenciales para la vida, tales como proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas etc. En muchas situaciones naturales, el nitrógeno aparece como un factor limitante del crecimiento, en particular de las plantas, ya que no obstante su abundancia en el aire, las plantas no lo pueden utilizar directamente sino a través de moléculas tales como nitratos o amonio presentes en los suelos.

En la naturaleza existen microorganismos capaces de convertir ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos asimilables para si mismos y para otros organismos. El proceso se denomina Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), consiste en una reacción metabólica que combina el nitrógeno atmosférico con hidrógeno para formar amoníaco. Estos procariontes se caracterizan por poseer el complejo enzimático de la nitrogenasa, que cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico según la siguiente reacción:



La estequiometría de la reacción revela la necesidad de una importante inversión de energía en la forma de ATP y equivalentes de reducción. Los microorganismos fijadores de nitrógeno se distribuyen en muy variados grupos taxonómicos y reducen el N₂ en diferentes situaciones, esto es, libres o en asociación más o menos íntima con plantas. Los microbios que llevan a cabo la FBN reciben el nombre de diazótrofos (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación). Entre las bacterias fijadoras en vida libre, las hay anaerobias estrictas y facultativas, aerobias y fotótrofas. Entre las asociaciones fijadoras, se encuentran rizocenosis diazotróficas (Ej.: *Gluconacetobacter* con gramíneas), simbiosis asociativas (Ej.: *Nostoc* con musgos y hepáticas) y rizoendobiosis diazotróficas (Ej.: *Rhizobium* con leguminosas).

El grupo de bacterias conocido colectivamente como rizobios induce la formación de estructuras especializadas en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas, denominados nódulos, que alojan a los rizobios. El nódulo constituye un ambiente apropiado para la expresión de la enzima nitrogenasa. Además de ATP y equivalentes de reducción, la FBN necesita un entorno con baja tensión de oxígeno, ya que la enzima nitrogenasa es inactivada irreversiblemente por O₂. Para protegerse del oxígeno, los sistemas fijadores de nitrógeno han

desarrollado, a lo largo de su evolución, una serie de estrategias fisiológicas para excluir total o parcialmente dicho gas de los lugares de fijación, entre los cuales se pueden citar: - una mayor actividad respiratoria en el caso de fijadores libres; - en cianofíceas, aunque con excepciones, algunas células se diferencian en formas especializadas llamadas heterocistos, en los cuales se localiza exclusivamente la nitrogenasa y es inactiva la fotosíntesis, - en los nódulos radicales de las leguminosas, donde existe un molécula semejante a la hemoglobina de la sangre, que mantiene niveles bajos de oxígeno libre, y regula el suministro de oxígeno al microbio para su respiración. Esta proteína refleja la complementariedad entre los dos organismos simbióticos, puesto que el grupo hemo- es sintetizado por la bacteria, y la globina es de origen vegetal.

La fuente de energía para la reducción de dinitrógeno varía según el tipo de organismo. Los organismos que fijan en vida libre deben generar su propia fuente de energía, mientras que los organismos simbióticos usan los fotosintatos producidos por la planta como fuente de ATP y poder reductor, por lo que es un proceso muy eficiente para la bacteria. Por esto, la fijación simbiótica es muy importante ya que a diferencia de la reducción química utiliza energía que depende de recursos renovables.

El interés que tienen las bacterias fijadoras de nitrógeno, especialmente los rizobios que establecen simbiosis con leguminosas, ha motivado la realización de investigaciones extensas básicas y aplicadas, incluyendo estudios sobre la diversidad y la taxonomía de los rizobios, y los mecanismos moleculares de la interacción simbiótica.

Importancia de la FBN

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado en los ecosistemas terrestres, estimada en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad 30 millones de toneladas se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc., 70 millones de toneladas mediante el proceso industrial de Haber-Bosch y 175 millones de toneladas mediante fijación biológica (Sevillano & Rodríguez-Barrueco, 1987).

El proceso industrial requiere poder reductor bajo la forma de hidrógeno, el cual es derivado del gas de petróleo, y altas temperaturas (300 a 600 °C) y altas presiones (200 a 800 atmósferas) para romper el triple enlace de la molécula de nitrógeno. Esta transformación química posee un elevado costo energético, estimándose que el 5% del consumo de gas natural a nivel mundial se destina al proceso de Haber-Bosch. Esto incide en el costo de los fertilizantes nitrogenados, afectados directamente por el costo del petróleo.

De los 175 millones de toneladas de nitrógeno fijado biológicamente, 35 millones se fijan mediante fijación en vida libre y 140 millones de toneladas mediante fijación simbiótica (Sevillano & Rodríguez-Barrueco, 1987)

El uso apropiado de la FBN resulta de la necesidad de incrementar la productividad agrícola y consecuentemente la producción de alimentos, para poder abastecer la población en constante aumento. Además, es importante por varias razones de naturaleza ambiental y económica: - por la conveniencia de disminuir el uso de fertilizantes por su costo y la posible escasez de materia prima (gas y petróleo), - por la contaminación del ambiente que conlleva su uso, - por su baja eficiencia de aprovechamiento, y por la necesidad de preservar los ecosistemas naturales. La aplicación de fertilizantes nitrogenados, sumado a otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos, con nitratos que representan un grave riesgo para la salud humana.

La interacción mutualista entre las leguminosas y los rizobios ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos 40 años. La simbiosis que establece las leguminosas con los rizobios es responsable del 60% de la FBN mundial, y provee a estas plantas y a otros cultivos una fuente de nitrógeno ilimitada y renovable. Se estima que mediante esta asociación entre 40 y 60 millones de toneladas de N son fijadas anualmente por las leguminosas, por lo que se calcula que US\$ 10 billones son ahorrados anualmente en fertilizantes.

La cualidad de los cultivos de leguminosas para enriquecer la fertilidad de los suelos, es un rasgo conocido desde hace mucho tiempo, y se utiliza en la práctica agrícola alternando cultivos que incluyan a las leguminosas. Además, la abundancia de raíces de esta familia de plantas hace también posible la mejora de las características físicas de suelos de zonas áridas y semiáridas. Es por ello que leguminosas arbustivas y arbóreas se emplean como plantas pioneras en la reforestación de suelos de esas regiones.

La asociación simbiótica fijadora de N₂ entre leguminosas y rizobios

En general, se considera a la simbiosis mutualista como la convivencia de dos organismos no semejantes en una relación de beneficio mutuo, generándose una interdependencia fisiológica. En particular, el establecimiento de la simbiosis entre rizobios y su planta hospedadora comienza con un reconocimiento específico

La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de

nodulación en ambos simbioses. En el interior de las células del nódulo, los rizobios se diferencian en bacteriodes, que es la forma especializada que lleva a cabo la FBN, utilizando fotosintatos de la planta, a cambio del aporte de compuestos nitrogenados.

Esta simbiosis es la adaptación a un medio deficitario en nitrógeno, ya que en suelos ricos en N, las leguminosas utilizan preferentemente el N inorgánico presente en el suelo. Si por el contrario, los niveles de N disponible son bajos, la planta estimula el inicio de una interacción que conduce a la formación de nódulos fijadores de N₂.

Como la planta debe producir los compuestos carbonados, existe una relación directa entre fotosíntesis y fijación biológica. Por lo tanto, la fijación biológica se relaciona estrechamente a la producción de biomasa aérea y rendimiento, ya que ambos procesos se encuentran afectados recíprocamente: cuanto mayor sea la biomasa aérea, mayor será la fotosíntesis, y habrá mayor fijación, y viceversa.

Las cepas de rizobios pueden caracterizarse mediante una serie de parámetros, como especificidad, infectividad, competitividad, efectividad y eficiencia. Mediante selección es posible se conseguir un buen balance entre estas características, aunque existen hoy suficientes conocimientos que sirven para manipular estos rasgos de tal forma que puedan alcanzarse mayores rendimientos de los cultivos. Sin embargo, el fruto del incremento de la infectividad o de la efectividad, esto es, la capacidad de producir nódulos o fijar nitrógeno, respectivamente, está limitado por la planta, no sólo por su grado de susceptibilidad a la infección, sino también por la dependencia energética de la fijación de la disponibilidad de fotosintetizado que llega a los nódulos desde las hojas y la mayor o menor facilidad del transporte del amonio incorporado.

Evolución de la simbiosis rizobio-leguminosa

La simbiosis formadora de nódulos en raíces (RNS, *Root Nodule Symbiosis*) incluye las leguminosas y las plantas actinomicorrícicas, que se asocian con las bacterias Gram negativas llamadas colectivamente rizobios y los actinomicetes Gram positivos del género *Frankia*, respectivamente. La asociación simbiótica fijadora de nitrógeno fue descrita por investigadores alemanes hace más de 100 años (Hellriegel & Wilfarth, 1888). Otra asociación que se encuentra en la mayoría de las plantas es la simbiosis con hongos micorrízicos, que favorecen su nutrición, facilitando la absorción de agua y nutrientes, principalmente fósforo, ya que las hifas del hongo en el exterior de la raíz actúan como prolongación de la misma, lo que permite explorar un mayor volumen de suelo. Se trata de una asociación endorrícica

mutualista hongo-planta, mucho más ancestral que la interacción entre rizobios y leguminosas y que es característica de la gran mayoría de las plantas superiores contemporáneas, que data de 450 millones de años, comparado con los 65 millones de años de RNS (Herendeen *et al.*, 1999; Brundrett, 2002; Soltis *et al.*, 2002). La hipótesis de una coevolución entre plantas y hongos sugiere que el origen de las plantas terrestres resultó de una integración con hongos que les suministraban agua y nutrientes (Douglas, 1994). En la simbiosis micorriza-planta, al igual que en la simbiosis rizobio-leguminosa, se pone de manifiesto un intercambio de señales de reconocimiento y aceptación entre los simbiosistas. Se propone que parte de la batería genética de la planta que controla el desarrollo del nódulo se originó durante la coevolución de las plantas arcaicas con los hongos micorrízicos (Parniske, 2000, 2008; Geurts *et al.*, 2005; Kistner *et al.*, 2005; Markmann & Parniske, 2009). Estos genes ancestrales habrían sido reclutados y adoptados por las leguminosas durante la evolución de la nodulación.

Diversidad de las plantas leguminosas y rizobios

Las leguminosas son muy diversas en su morfología, hábitat y ecología, desde las plantas anuales del ártico, hasta los árboles tropicales. Sin embargo, la gran mayoría de ellas son infectadas por los rizobios (Young & Johnston, 1989). Con aproximadamente 700 géneros y 18000 especies, la familia *Leguminosae* es la tercer familia más numerosa de las plantas con flores (Angiospermas). La familia *Leguminosae* se divide en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Existen cerca de 152 géneros y 2800 especies en *Caesalpinioideae*, cerca de la misma cantidad en *Mimosoideae* y 480 géneros con 12000 especies en *Papilionoideae* (Somasegaran & Hoben, 1994). El proceso de nodulación ha sido encontrado en más del 90 % de las plantas pertenecientes a las subfamilias *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, y en un 30 % de las *Caesalpinioideae* (Vincent, 1982).

Las leguminosas representan una fuente directa de alimentación humana y también son utilizadas como forraje para consumo animal. Otra propiedad de las leguminosas que remarca su importancia a nivel de producción agrícola es el alto contenido proteico de sus granos, con niveles dos o tres veces superiores al de los cereales. Además, proveen el 33% del total de proteína consumida en la dieta humana (Vance *et al.*, 2000), porcentaje que puede duplicarse en el caso de aquellas poblaciones de regiones pobres o que se encuentran en vías de desarrollo (Vance *et al.*, 2000; Graham & Vance, 2003).

Como fuera descripto más arriba, la fijación de nitrógeno (diazotrofia) es un proceso exclusivo de procariontes. Sólo 6 de las aproximadamente 53 phyla o linajes de Bacteria

cuentan con especies fijadoras de nitrógeno. Este recuento corresponde a los diazótrofos que han sido cultivados, y es muy probable que también existan otros comprendidos en phyla de bacterias no cultivables o entre los que sólo se han podido cultivar recientemente. Estos organismos constituyen un grupo taxonómico heterogéneo que comparten la única característica de poseer la enzima nitrogenasa. Estas bacterias comprenden organismos fotótrofos, pertenecientes a la familia *Rhodospirillaceae*, *Clorobiaceae* y *Cianobacteriae*; organismos quimioautótrofos, como bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y organismos heterótrofos como las bacterias pertenecientes a la familia *Frankiaceae*, al grupo *Rhizobiaceae*, estudiado en este trabajo, y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent & Sprent, 1990). En particular, la taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. También se encontraron algunas arqueas metanógenas capaces de fijar nitrógeno (Postgate, 1998).

La mayoría de estos microorganismos se han agrupado en el orden *Rhizobiales* dentro de la subdivisión o grupo denominado α - proteobacterias. En la actualidad se han descrito más de 40 especies pertenecientes a 8 Géneros distribuidos en 4 familias (*Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae* (Madigan *et al.*, 2000). Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de nitrógeno: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Young & Haukka, 1996; de Lajudie *et al.*, 1998a; de Lajudie *et al.*, 1998b; Sprent, 2007). El hallazgo relativamente reciente de cepas nodulantes dentro de la sub-división β -proteobacteria (Moulin *et al.*, 2001) amplió el inventario de diazótrofos capaces de nodular dentro de la división Proteobacteria con la descripción de dos nuevas ramas de simbiontes asignadas a los géneros *Burkholderia* y *Wautersia* (Vaneechoutte *et al.*, 2004).

Etapas de la infección y la nodulación

Las plantas, en contacto con los rizobios compatibles, responden a través de una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares. Estas etapas que pueden separarse espacial y temporalmente, se llevan a cabo en forma coordinada. Los eventos más tempranos tienen lugar en la epidermis de las células, donde son evidentes cambios en la morfología del pelo radical. Paralelamente, en el córtex, se activa la división celular que dará lugar al primordio de nódulo que alojará las bacterias que logran invadir las células de las plantas.

En las secciones que siguen se describen las etapas principales que se identifican en la formación del nódulo, así como los componentes de las bacterias y de la planta que son esenciales en la simbiosis.

Primer contacto entre simbiosites: flavonoides y factores de nodulación

Las plantas leguminosas liberan a la rizósfera moléculas que, en muchos casos, actúan como quimioattractantes bacterianos. Entre estos compuestos exudados se encuentran flavonoides (derivados de 2-fenil-1,4 benzopirona) y no-flavonoides que incluyen a betaínas y ácidos aldónicos (Downie, 1994; Phillips & Streit, 1996; Spaink, 2000). El espectro de los flavonoides sintetizados depende del estado fisiológico y edad de la planta. En respuesta a los flavonoides de la planta, los rizobios sintetizan otra molécula señal, los factores de nodulación (NF, por *nod factor*). La naturaleza de ambas señales, flavonoides y factores de nodulación, es central para el establecimiento de una interacción específica, garantizando que la planta hospedadora sólo permita la simbiosis con el rizobio compatible.

Factores Nod, lipoquitooligosacáridos sintetizados por los rizobios

En el año 1990 se identificó el factor responsable de provocar cambios en los pelos radicales, y que pasó a denominarse factor Nod. Esta molécula de señalización fue purificada a partir del análisis de una fracción del medio de cultivo de rizobios suplementado con inductores de los genes de nodulación (flavonoides). Considerada la molécula del año (Lerouge *et al.*, 1990), su estructura química fue determinada en varias especies de rizobios. La estructura química básica del factor o factores de nodulación es compleja, pero con gran semejanza entre los producidos por las distintas especies de *Rhizobium*.

La genética de la nodulación del rizobio ha sido muy estudiada y actualmente se dispone de un conocimiento detallado de la organización y regulación de los genes bacterianos requeridos para la simbiosis. Los genes de nodulación se definen como aquellos necesarios para que ocurra el proceso o que se expresan coordinadamente con estos. Aunque son llamados de modo general como genes *nod*, comprenden a los genes colectivamente designados como *nod*, *nol* y *noe*. Estos genes están generalmente agrupados bien en plásmidos o en una región del cromosoma. Los genes de nodulación se agrupan generalmente en “regulatorios” (*nodD*), “comunes” (*nodABC*), y “específicos de hospedador” (Hsn) (van Rhijn *et al.*, 1995; Dénarié, 1996). NodD es una proteína bacteriana que funciona como

activador transcripcional de los genes de nodulación. Los genes *nod* están precedidos por una secuencia de ADN denominadas cajas *nod*, que es reconocida por la proteína NodD. Cada proteína NodD responde a un tipo característico de flavonoides (Spaink *et al.*, 1987). Por esta razón, NodD es un determinante de la especificidad de nodulación del hospedador. La activación de los genes *nod* por el complejo flavonoides-NodD-caja *nod* tiene como resultado la biosíntesis de proteínas implicadas en la producción y excreción de moléculas señal, los NF, que son lipo-quito-oligosacáridos (LCOs, del inglés: *lipo-chitin oligosaccharides*). Su estructura consiste en un esqueleto oligosacarídico de *N*-acetil-glucosaminas unidas por enlaces $\beta(1-4)$. Su longitud varía entre 2 y 5 residuos, dependiendo de la especie de rizobio. Presentan en el extremo no reductor un ácido graso de longitud y saturación variable. Además pueden llevar distintos sustituyentes tanto en el extremo reductor como en el no reductor. En la **Figura 1** se muestra la estructura básica, con la diferentes decoraciones que puede llegar a presentar el esqueleto básico del FN.

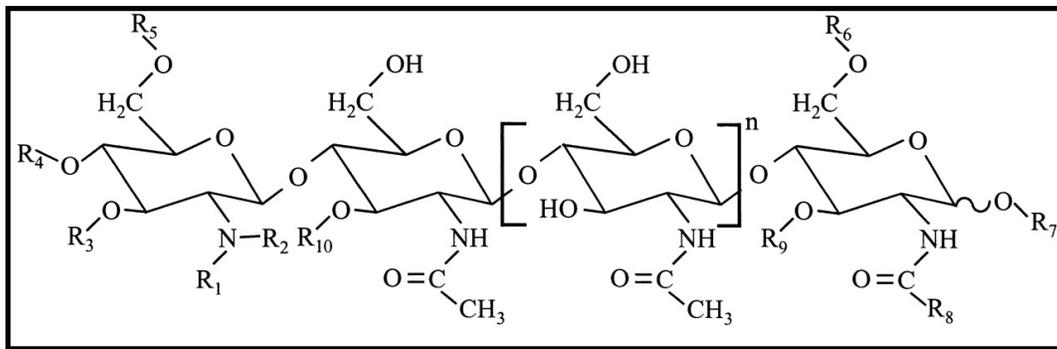


Figura 1. Estructura genérica de los LCOs producidos por diferentes rizobios. Las posibles modificaciones introducidas incluyen: R1) variaciones en el grado de insaturación y en el largo de la cadena acilo, R2) metil, R3) carbamoil, R4) carbamoil, R5) carbamoil y acetil, R6) acetil, R7) fucosil, R8) acetil, fucosil, R9) manosil y glicerol, R10) arabinosil (Figura tomada de D’Haeze & Holsters, 2002).

La biosíntesis del esqueleto de los NF es catalizada por los productos de los genes *nodA*, *nodB*, y *nodC*. La proteína NodC presenta actividad *N*-acetilglucosamina $\beta,1-4$ transferasa (quitina sintasa); NodB es una deacetilasa que elimina el grupo acetilo del extremo no reductor y NodA transfiere el ácido graso a esta posición (Geremia *et al.*, 1994). Existen muchos otros genes involucrados en la modificación específica de la estructura básica del NF en las diferentes especies de rizobio. Las decoraciones del esqueleto confieren la especificidad de hospedador (Fisher & Long 1992; Dénarié & Cullimore 1993; Schultze *et al.*, 1994; van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Denarie *et al.* 1996; Mergaert *et al.*, 1997; Perret *et al.*, 2000) y su síntesis está determinada por los genes *nod* específicos. Una modificación frecuente en la posición amino (-N) del extremo no reductor (R2) es la introducción de un

grupo metilo, llevado a cabo por NodS (Geelen *et al.*, 1993; Jabbouri *et al.*, 1995). La proteína NodU está involucrada en la incorporación de un grupo carbamoil en la posición R3 ó R4. La sustitución más frecuente corresponde a la posición R6 del extremo reductor, en la cual se puede detectar sulfatación (determinado por los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ*), la acetilación (*nodX*), glicosilación (metilfucosa, acetilfucosa, acetilmetilfucosa y sulfatometilfucosa, en la que participa el producto del gen *nolZ* codificante de una fucosil-transferasa (Stacey *et al.*, 1994; Quinto *et al.*, 1997), y la acetilación de la fucosa es producto de la actividad de la proteína NolL (Corvera *et al.*, 1999). La transcripción de la mayoría de los genes *nod* se reprime en la etapa posterior a la diferenciación de la bacteria en bacteroide, cambio que ocurre ya dentro de la célula eucariota (Sharma & Signer 1990; Schlaman *et al.*, 1991; Krause *et al.*, 1997).

Los NF purificados son capaces de inducir en la planta reacciones similares a las que producen los rizobios, reiniciando la división de las células ya diferenciadas del córtex de la planta. Por ello a los NF se los considera intrínsecamente como morfógenos y se ha sugerido que su estructura imita señales u hormonas de la propia planta, aún no identificadas. Los NF son requeridos durante las etapas tempranas de la interacción para el desarrollo de los hilos de infección y la invasión de la célula vegetal. Son activos a concentraciones muy bajas similares a la de las hormonas.

El análisis comparativo de la estructura de los NF de diversos rizobios con diferentes capacidades para reconocer hospedadores no permiten concluir que el NF constituye el único determinante de reconocimiento y rango de hospedador (van Rhijn *et al.*, 1995; Perret *et al.*, 2000; Smit *et al.*, 2007). Mas aún, recientemente, se describieron un grupo de bradirizobios fotosintéticos, que forman nódulos pero que no sintetizan NF (Giraud *et al.*, 2007).

Especificidad de la asociación simbiótica

En general, cada rizobio es capaz de formar nódulos en un número restringido de plantas leguminosas, y cada una de las mismas es nodulada por un pequeño grupo de rizobios.

La coevolución de los rizobios y las leguminosas ha llevado a la especialización de los factores de nodulación que han generado una amplia gama de decoraciones para adecuarse a su hospedador, en algunos casos con alta especificidad como el caso de *Azorhizobium caulinodans*, que sólo nodula a *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988) y en el extremo opuesto se encuentra la cepa con la mayor promiscuidad reportada, *Sinorhizobium* sp.

NGR234 que abarca un amplio rango de hospedador, nodula a 232 (51%) de 452 leguminosas probadas (Pueppke *et al.*, 1999).

La capacidad de un determinado rizobio de producir NF con estructuras diferentes se ha relacionado con la capacidad de ser reconocido por un amplio rango de hospedadores (Burn *et al.*, 1987; McIver *et al.*, 1989). Probablemente la forma ancestral de los NF fue promiscua, y conforme el rizobio fue coevolucionando con su hospedador, el juego de señales de la pareja se fue especializando para producir las relaciones de promiscuidad o especificidad entre ambos miembros de la pareja de simbiosis (Broughton *et al.*, 2000).

Estructura de los factores de nodulación producidos por microsimbiontes de poroto

El poroto, como otras leguminosas, libera a la rizósfera una serie de flavonoides que inducen la síntesis de NF por parte de los rizobios. Las principales molécula señal sintetizadas por poroto incluyen cumestrol, daidzeina, eriodictiol, naringenina y liquiritigenina (Hungria *et al.*, 1991; Bolanos-Vásquez & Werner, 1997).

La planta de poroto puede ser nodulada por un grupo muy heterogéneo de rizobios (Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993; Pinero *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de ser una hospedadora promiscua, existen preferencias por un determinado tipo de decoración en el NF, manifestándose en una jerarquía de preferencias donde la acetil fucosa en el extremo reductor es preferida por sobre otras modificaciones (Corvera *et al.*, 1999; Laeremans *et al.*, 1999), lo que no limita su capacidad de responder a una gran variedad de NF, desde muy sencillos estructuralmente como los producidos por *Rhizobium* GRH2 (López-Lara *et al.*, 1995) hasta otros más complejos, como los de *R. etli* CFN42, *R. tropici* CIAT899 ó CFN299 (Cárdenas *et al.*, 1995; Poupot *et al.*, 1995; Folch-Mallol *et al.*, 1996). Una cepa de *R. etli*, KIM5s, sintetiza LCOs muy distintos a los de *R. etli* CFN42, ya que se encontró que produce oligómeros de 6 unidades de GlcNAc, con ácido vaccénico y un grupo metilo en el extremo no reductor como únicos sustituyentes (Pacios-Bras *et al.*, 2002). A pesar de la baja complejidad de sus LCOs, esta cepa es muy competitiva por la ocupación de nódulos (Josephson *et al.*, 1984; Streit *et al.*, 1992), por lo que esta molécula *per se* no afectaría directamente la eficiencia de nodulación ni la competencia por la ocupación de nódulos. Sin embargo, las condiciones de inducción *in vitro* no necesariamente reflejan las que se presentan en el exudado de las raíces, que inducirían en KIM5s la producción de una gama de LCOs diferentes (más decorados) que los obtenidos con la inducción con naringenina en el laboratorio.

Las especies *R. etli* y *M. loti*, simbioses de poroto y Lotus, respectivamente, producen LCOs cuyo componente principal es un polímero de 5 residuos de GlcNAc con ácido vacénico (C18:1) en el extremo no reductor, y una acetilfucosa en el C6 del residuo de N-acetil glucosamina del extremo reductor. CE3 puede nodular *Lotus japonicus* y *Lotus corniculatus*, a pesar de que estas leguminosas no son su hospedador natural (Bamba *et al.*, 2001, Hernández-Lucas *et al.*, 2001), sin embargo, la esta cepa no persiste en los nódulos formados en estas leguminosas, y la infección crónica no se establece.

Los NF con un grupo metilo en la posición R2 son más activos en cuanto a la deformación de los pelos radicales y rearrreglo del citoesqueleto de actina en raíces de poroto, comparados con NF no metilados. El efecto de otras modificaciones, sin embargo, provocan las mismas respuestas, independientemente de su presencia o no en el esqueleto del NF, como la acetilación de la fucosa en el extremo reductor del NF y el grupo carbamoil en R3 ó R4 (Cárdenas *et al.*, 2002). En concordancia con estos resultados, un mutante de *R. etli* en *nolL*, responsable de la o-acetilación de la fucosa, tiene un efecto insignificante en la tasa de nodulación de Negro Jamapa, por lo que este sustituyente no sería indispensable para la nodulación de *P. vulgaris*, sin embargo no descartan un posible rol en la nodulación de otros cultivares, posiblemente incrementando la eficiencia de nodulación (Corvera *et al.*, 1999). Por otro lado, mutantes de rizobios en los genes *nodZ* y *nolL*, responsables de la incorporación de la fucosa y de la acetilación de la misma, respectivamente, en el extremo reductor del NF, poseen fenotipos asociados al hospedador en *Lotus* sp. (Rodpothong *et al.*, 2009).

La elucidación del significado de la producción de mezclas de NF y el posible rol fisiológico en la interacción, son preguntas que han sido abordada parcialmente por algunos investigadores (Schultze *et al.*, 1992). En *S. meliloti*, los rasgos estructurales tales como la longitud de la cadena, la acilación en el extremo no reductor y la sulfatación en el terminal reductor parecen determinar la estabilidad de las moléculas frente a las quitinasas producidas por las raíces de *Medicago* spp. (Staehelin *et al.*, 1994). Por otro lado, ciertas modificaciones incrementan la resistencia a la degradación, pero disminuyen la actividad biológica (Staehelin *et al.*, 2000).

En ambientes naturales, las ventajas competitivas entre dos o más cepas de rizobios determinan el éxito en la colonización de la leguminosa (Aguilar *et al.*, 2004). Se puede suponer que la competitividad resulta de la contribución de diversas características genéticas y fenotípicas de la bacteria, tales como la movilidad (Althabegoiti *et al.*, 2008) y las características de la superficie celular (González *et al.*, 1996; Summers *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2006). Las moléculas superficiales de las células incluyen a los polisacáridos

extracelulares (ó exopolisacáridos, EPS), lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares (KPS) (Broughton *et al.*, 1999; Perret *et al.*, 2000).

Polisacáridos y componentes de superficie: otros componentes de la bacteria requeridos para el proceso de infección y nodulación

Como se ha descrito en la sección anterior, los NF tienen un papel clave en la inducción de las etapas iniciales de nodulación. Sin embargo, otros requerimientos son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos. Los constituyentes de superficie de los rizobios que han sido estudiados en relación a su función en la simbiosis son: EPS, LPS, KPS y glucanos cíclicos. En muchos casos los mutantes presentan diferentes fenotipos simbióticos dependiendo de la pareja planta-rizobio. Se sugiere que los EPSs están implicados en suprimir la reacción de defensa de la planta y parecen ser requeridos para la infección de los pelos radicales (Parniske *et al.*, 1994). En general, los EPS se requieren para nodular plantas que forman nódulos indeterminados (Ej. alfalfa) (González *et al.*, 1996) y los LPS para nodular plantas que forman nódulos determinados (Ej. poroto) (Kijne *et al.*, 1992). Como en el caso de EPS y KPS, se ha propuesto que el LPS funcione como señal o bien sea necesario para evadir la respuesta de defensa de la planta (Perotto *et al.*, 1994). Los beta-glucanos cíclicos son moléculas cíclicas de glucosa, están presentes en el periplasma y también se secretan al medio. Al igual que otros polisacáridos de superficie, funcionarían como supresores de la respuesta de defensa de la planta (Gibson *et al.*, 2008).

Respuestas de las plantas a los NF

Cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas: una serie de cambios fisiológicos ocurren en las células de las plantas luego de que son percibidos los NF de los rizobios compatibles. La susceptibilidad de los pelos radicales a los NF depende de su estadio de desarrollo (Hadri & Bisseling, 1998). Una de las primeras respuestas observadas en los pelos de epidermis de la planta es la alcalinización del citosol, y despolarización de la membrana.

Pocos minutos después de que la planta percibe la presencia de rizobios, los pelos radicales, en contacto con las señales producidas por los rizobios se hinchan en la punta presentando un aspecto refringente debido a la detención del crecimiento polar, que luego se reinicia en una nueva dirección produciendo un crecimiento isotrópico (**Figura 2**), redireccionando el

crecimiento del pelo. Dichas modificaciones implican un rearrreglo de los filamentos de actina (van Batenburg *et al.*, 1986)

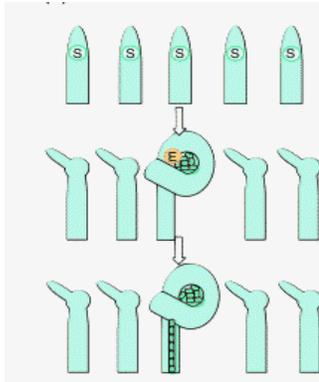


Figura 2. Representación esquemática de las respuestas observadas en los pelos radicales. Un complejo receptor de señalización se activa en todas las células epidérmicas de la zona susceptible a la infección (S). Sólo un número limitado de pelos se deforma (*curling*), vía señalización de un complejo receptor de entrada (E), permitiendo la infección y subsiguiente formación del hilo de infección. Adaptado de Geurts *et al.*, 2005.

En la zona del ápice del pelo radical, donde ocurren estos cambios, la pared celular se hidroliza, la membrana plasmática se invagina y un nuevo depósito de pared celular se lleva a cabo formando una estructura tubular, el hilo de infección, o *infection thread* (IT) (Mylona *et al.*, 1995). Algunas bacterias quedan atrapadas por este enrollado y permanecen unidas a la superficie de la raíz probablemente a través de los exopolisacáridos de superficie (SPS) que tienen capacidad de unirse a las lectinas ubicadas en particular en la punta de los pelos radicales (Díaz *et al.*, 1995). El rizobio penetra y se divide dentro del IT, el cual subsecuentemente transvasa el pelo radical y se ramifica en las células corticales (van Brussel *et al.*, 1992; Brewin, 2004; Gage, 2004). La formación del IT está determinada por la planta aunque necesita de la presencia de la bacteria, ya que sin ésta no se observa la aparición de verdaderos IT (Gage, 2004). En la imagen de la **Figura 3** se observa un IT formado por bacterias fluorescentes, avanzando hacia las células corticales.

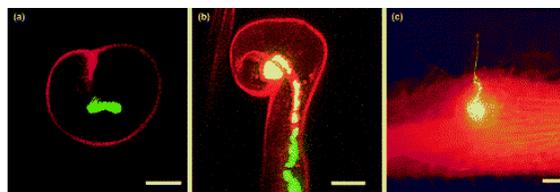


Figura 3. (a) Imagen de un pelo radical inoculado con un rizobio marcado con GFP atrapado en la punta del pelo. **(b)** IT creciendo hacia dentro del pelo. **(c)** IT avanzando hacia el primordio del nódulo formado en las capas corticales internas de la raíz. Imagen tomada de Geurts *et al.*, 2005.

El número de ITs iniciados en el hospedador luego de la inoculación con un rizobio compatible usualmente excede grandemente al número de nódulos que luego eventualmente se desarrollan. Este hecho sugiere que el hospedador modula activamente la extensión de los

IT iniciados o bien el movimiento de los rizobios hacia la célula eucariota. Numerosos autores postularon que el desarrollo de la mayoría de los nódulos potenciales es suprimido por la planta hospedadora rápidamente luego de la invasión inicial de la bacteria al pelo radical (Caetano-Anolles & Gresshoff, 1991).

La planta controla la tasa de infección, la distribución de la misma, y cuántas de las infecciones progresan a nódulos fijadores de nitrógeno mediante la activación de muchas funciones descritas durante las respuestas de hipersensibilidad que desencadenan los patógenos (Hirsch, 1992). Desde que la bacteria entra en contacto con la raíz hasta que se transforma en bacteroide activo, está sujeto a una situación continua de rechazo que tiene que superar, y su control es fundamental para la buena marcha de la asociación en su camino hacia una nodulación efectiva. El balance final de la interacción dependerá del contenido de exo y lipopolisacáridos y de los glucanos cíclicos, componentes de superficie de los rizobios. Estas moléculas pueden inhibir los sistemas de defensa de la planta o bien hacer que las bacterias resistan a estos mecanismos. Intensas reacciones de defensa pueden también estar sumamente implicadas en el desarrollo de los IT, gran parte de los cuales son bloqueados o abortados en estadios tempranos de preinfección (Broughton y Perret, 1999; Brewin, 2004). Además de los mecanismos que controlan al endosimbionte en la planta hospedadora, las leguminosas tienen la capacidad de autorregular el número de nódulos formados en sus raíces, mediante señales sistémicas que involucran a la parte aérea de la planta (Koosslak & Behloul, 1984; Abd-Alla, 1999; Oka-kira & Kawaguchi 2006 Magori & Kawaguchi, 2009). El modelo propuesto en *L. japonicus* de autorregulación de la nodulación (AON) mediado por un receptor tipo quinasa rico en leucina (RLK-LRR) se esquematiza en la **Figura 4**, e involucra la síntesis en la raíz, tras la percepción del NF, de compuestos inhibitorios que actúan a distancia (RDS: *root derived signal*). La mayor evidencia de la naturaleza de esta señal sugiere que los mejores candidatos son péptidos (CLE-RS1/2), que se transportan al tallo, donde inducen la síntesis de otra señal (SDS: *shoot derived signal*), en el que participan receptores tipo quinasa (HAR1/NARK/SUNN/SYM29 y KLAVIER). La señal sintetizada en el tallo se transloca a la raíz, donde regula negativamente la nodulación a través de TML/RDH1.

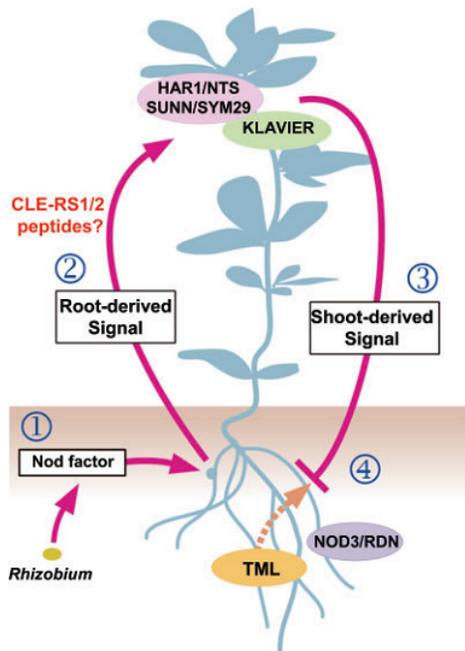


Figura 4. Autorregulación de la nodulación. (1) La percepción del factor Nod induce en la raíz la síntesis de una RDS, de naturaleza peptídica, que es transportada al tallo (2), donde inducen la síntesis de otra señal mediada por receptores tipo quinasa. Esta señal generada en el tallo se transloca a la raíz (3), donde regula negativamente la nodulación (4). NOD3 y RDN, de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*, respectivamente, que actúan en la raíz, tendrían un rol en la transmisión de la señal de la raíz, o la percepción de la señal generada en el tallo. Imagen extraída de Kouchi *et al.*, 2010.

Genes del hospedador requeridos en la simbiosis

El reconocimiento de los NF por los receptores de la planta abre la puerta para la infección. La deformación tiene lugar en aquellos pelos jóvenes que se encuentran en estado activo de crecimiento. Si el reconocimiento de los NF es responsable de la deformación del pelo radical, estos deben poseer también receptores específicos para los NF (Relic *et al.*, 1994; D'Haese *et al.*, 1998). Así, se identificaron en *L. japonicus* dos genes que codificarían para receptores, NFR1 y NFR5 (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006). También se identificaron los receptores en otras leguminosas: *Glycine max* (Indrasumunar *et al.*, 2010), LYK3 y NFP en *M. truncatula* (Limpens *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006), y SYM37 y SYM10 en *Pisum sativum* (Zhukov *et al.*, 2008). Estos codificarían proteínas tipo quinasas con dominios transmembrana LysM. Variantes mutantes en estos genes muestran un fenotipo defectivo en simbiosis (Nod⁻) y son candidatos para cumplir la función de percepción de los NF, y por ende para el reconocimiento de rizobios compatibles en *L. japonicus* (Radutoiu *et al.*, 2003, 2007). De acuerdo al modelo propuesto por Radutoiu *et al.*, (2003), NFR1 y NFR5 formarían un heterodímero capaz de reconocer a los NF con sus dominios LysM extracelulares, y serían requeridos para desencadenar las respuestas fisiológicas y moleculares en las raíces de las plantas leguminosas. Mutaciones en NFR1 y NFR5 previenen todas las respuestas inducidas por LCOs. Incluso se encontró que la especificidad de

interacción está dada por estos receptores ya que la transferencia de los genes *NFR1* y *NFR5* de *L. japonicus* a *M. truncatula* confiere a esta última la capacidad de ser nodulados por el simbionte de *L. japonicus*, *Mesorhizobium loti*, reafirmando su posible función como receptores (Radutoiu *et al.*, 2007).

La percepción temprana de los NF provoca cambios en las concentraciones de calcio. De este modo, los canales de calcio sensibles a voltaje se abrirían, produciendo un acelerado pico de calcio (Berridge, 1993). La frecuencia en la apertura y cierre de estos canales iónicos originan el “*calcium spiking*”. En el progreso de identificación de genes y funciones se han descrito posibles canales catiónicos: *castor* y *pollux* (o su homólogo en *Medicago truncatula dmi1*), y un receptor tipo quinasa, *symrk* (o *Mtdmi2*) con dominios ricos en leucina (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Las plantas mutantes *dmi3*, afectadas en una CCaMK (*Calcium and calmodulin-dependent protein kinase*) (Mitra *et al.*, 2004) retienen la capacidad para inducir el “*calcium spiking*” pero pierden las respuestas *downstream*, como la inducción de genes activados por el NF, denominados colectivamente nodulinas, y el desarrollo del nuevo órgano. Se especula que el producto de *dmi1* (Castor y Pollux en *L. japonicus*) participa en la liberación de calcio desde el núcleo y el retículo endoplásmico (Ane *et al.*, 2004; Riely *et al.*, 2007; Charpentier *et al.*, 2008), mientras que DMI3 actuaría como sensor de los picos de calcio, desencadenando una serie de respuestas que activa la inducción de nodulinas (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004). Las nucleoporinas NUP85 y NUP183 también son importantes para la generación de las señales de calcio (Kanamori *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2007; Meier & Brkljacic, 2009). Una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, CCaMK, (*Ca²⁺ and calmodulin (CaM)-dependent protein kinase*) percibiría las oscilaciones de calcio, que a su vez activarían la expresión de genes de nodulación a través de tres reguladores transcripcionales, dos pertenecientes a la familia GRAS (NSP1 y NSP2) y uno perteneciente a la familia ERF (Levy *et al.*, 2004; Heckmann *et al.*, 2006; Middleton *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2009). También ha sido descrito otro factor de transcripción, *MtHAP2*, que es esencial para el desarrollo del nódulo (Combiér *et al.*, 2006)

Recientemente ha surgido evidencia de que las proteínas GRAS serían capaces de formar un complejo en el DNA (Hirsch *et al.*, 2009). A su vez, el factor de transcripción ERF y dos homólogos cercanamente relacionados se unen al promotor de *ENOD11*, un gen de nodulina temprano inducido en la epidermis, lo que refuerza la idea de que participe en la activación de nodulinas (Andriankaja *et al.*, 2007).

Simultáneamente a la formación del IT y los cambios en la epidermis, determinadas células del córtex sufren una serie de cambios morfológicos, como reorganización de los

microtúbulos, migración del núcleo hacia el centro de la célula y la formación radial de nuevas paredes celulares, lo que se traduce en una reactivación de la actividad mitótica, que origina lo que se denomina primordio nodular (Kondorosi & Kondorosi, 2004). La activación del ciclo celular en las células del córtex está marcada por la expresión de genes del ciclo celular, como ciclinas y CDK (*ciclin dependent kinase*) (Yang *et al.*, 1994), que forman el hilo de preinfección, que es la estructura que precede al IT (Van Brussel *et al.*, 1992; Timmers *et al.*, 1999). Esta diferenciación, junto a la activación de genes del ciclo celular, indica que la infección y las divisiones celulares están relacionadas (Van Brussel *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994; Timmers *et al.*, 1999; Foucher and Kondorosi, 2000; Roudier *et al.*, 2003).

Se distinguen dos tipos de nódulos en función de las células del córtex que entran en mitosis, determinado e indeterminado. En Lotus, soja y poroto, leguminosas tropicales que forman nódulos determinados, la actividad meristemática de las células del córtex externo está restringida a las etapas tempranas de desarrollo del nódulo, y los nódulos formados adquieren un aspecto redondeado. En cambio, en leguminosas de climas templados, como *M. sativa*, *M. truncatula* y *P. sativum*, las células del córtex externo que comienzan a multiplicarse dan lugar a un meristema persistente. Los nódulos que se forman de tipo indeterminado son alargados (Gage, 2004).

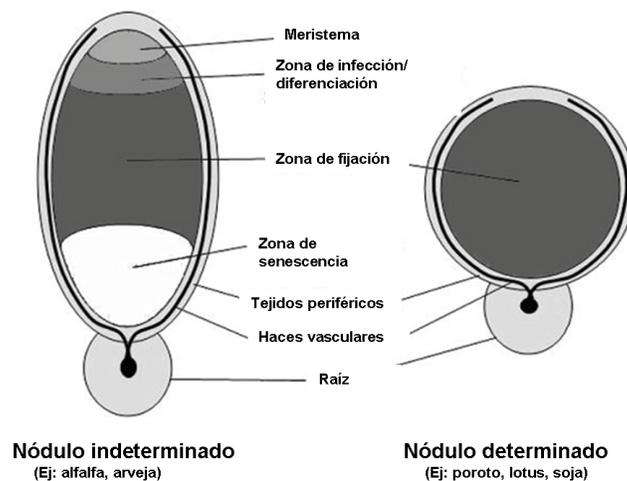


Figura 5. Arquitectura de nódulos indeterminado y determinado. Adaptado de Maunoury *et al.*, 2008.

La transducción de la señal percibida por la planta es bastante compleja, con una gran cantidad de genes implicados en los múltiples pasos del proceso. En la **Figura 6** se representa la vía de señalización simbiótica temprana, desde la percepción de los NF.

La infección puede ser separada de la organogénesis del nódulo, pudiendo ocurrir la organogénesis en ausencia de infección bacteriana e infección en ausencia de organogénesis (Gleason *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007). Sin embargo, para generar un nódulo infectado con bacterias ambos procesos deben estar finamente coordinados entre sí, en particular porque el primordio del nódulo se debe desarrollar en forma subyacente al sitio de infección. Tras diversos intentos de dilucidar el mecanismo por el cual ocurre esta coordinación, se identificó un mutante (*snf1*) en *M. truncatula*, con ganancia de función en CCaMK que nodula espontáneamente, activando a la nodulina ENOD11 en las células epidérmicas y corticales de la misma manera que cuando la nodulación es inducida por rizobios (Journet *et al.*, 1994; Tirichine *et al.*, 2006; Madsen *et al.*, 2010).

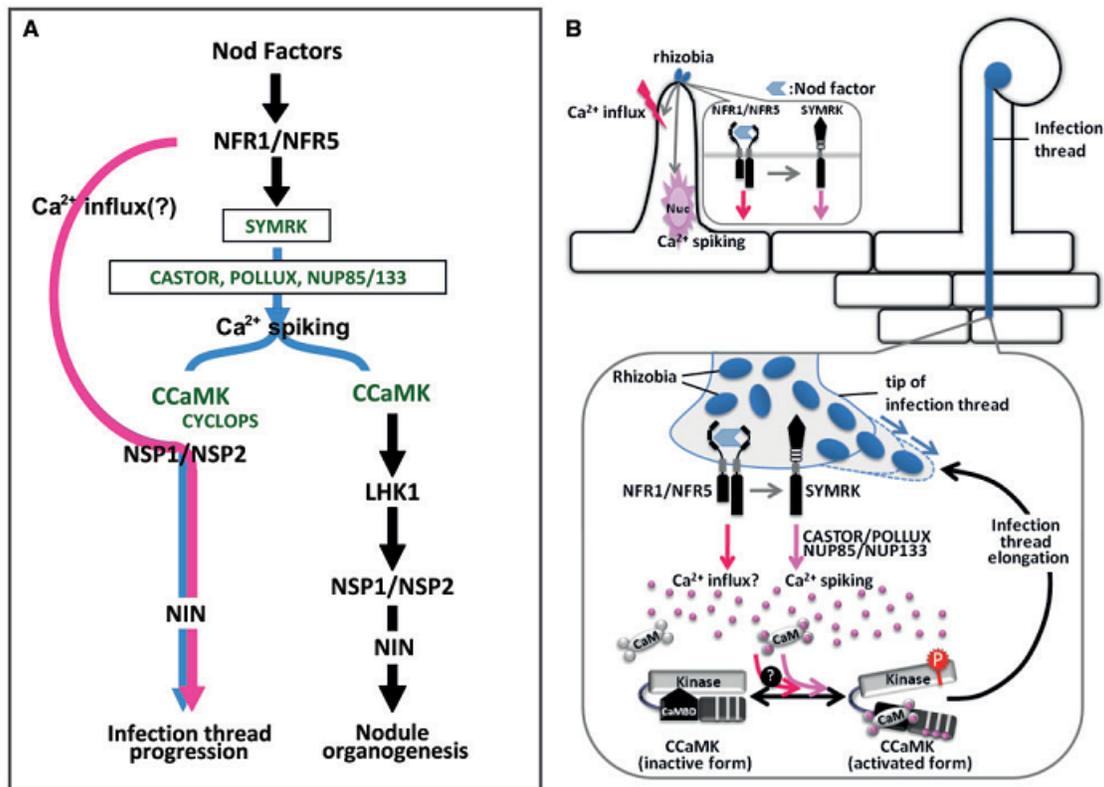


Figura 6. Modelo actual propuesto del SSP (*symbiotic signaling pathway*). (A) En respuesta a los NF, la señal generada por los receptores NFR1/NFR5 se divide en dos vías; una hacia el CSP (*common symbiosis pathway*, señalada con la línea azul), y la otra, señalada con la línea rosada, es prerequisite para la infección de los rizobios. Los 7 genes del CSP están indicados en verde. La integración de las respuestas de la epidermis con las del córtex está mediada por *NIN* (*NODULE INCEPTION*) (Schäuser *et al.*, 1999; Marsh, 2007). Mutaciones en este gen provocan la ausencia de formación de IT en la epidermis y formación del nódulo en el córtex. (B) Señalización por Ca^{2+} y activación de CCaMK en la formación y crecimiento del IT. Extraído de Kouchi *et al.*, 2010.

Expresión de nodulinas o genes marcadores de nodulación

Los genes simbióticos identificados con rol en la nodulación son las llamadas “nodulinas” (Kouchi & Hata, 1993; Colebatch *et al.*, 2002). Para identificar estos genes se han comparado espectros de genes expresados en plantas noduladas con raíces no inoculadas. Este abordaje ha permitido diferenciar entre “nodulinas tempranas” activadas antes de la aparición de la fijación de nitrógeno y “nodulinas tardías” que aparecen durante y después del comienzo de la fijación de nitrógeno (Kouchi *et al.*, 2003).

La mayoría de los genes encontrados están presentes en no leguminosas y, de hecho, muchos han sido bien estudiados en *Arabidopsis* y otras especies vegetales. Así se ha visto que la nodulina ENOD40 afecta en tabaco la elongación de ciertas células por alteración de la cinética de la biosíntesis de etileno. En leguminosas está relacionada con el balance hormonal durante los estadios iniciales del establecimiento del nódulo (Fang & Hirsch, 1998). Esta nodulina parece controlar la relación entre auxinas y citoquininas, que se altera significativamente después de la inoculación con *Rhizobium* y juega un papel importante en la formación del primordio nodular y anatomía general del nódulo (Hirsch & La Rue, 1997; Mathesius *et al.*, 1998).

Otras están relacionadas con la formación de estructuras simbióticas, como por ejemplo la nodulina temprana ENOD2, activamente sintetizada en el parénquima nodular, mientras que las nodulinas ENOD5 y ENOD12 están localizadas en las paredes del IT (Mylona *et al.*, 1995). La nodulina N-26, sintetizada durante la liberación de las bacterias del IT, es un componente de la PBM, y puede estar relacionada con el transporte de nutrientes entre los simbioses.

Muchas nodulinas tempranas codifican para PRPs (proteínas ricas en prolina, del inglés *Proline Rich Proteins*), como *ENOD10* (Lobler & Hirsch, 1993), *MfPRP4* (Wilson *et al.*, 1994), y *ENOD11*. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de las extensinas, proteínas ubicadas en la pared celular (Kieliszewski & Lamport, 1994), con capacidad de generar uniones covalente. Esta reacción estaría mediada por peroxidasas, que facilitarían la producción de peróxido de hidrógeno como sustrato. La coincidencia en la expresión espacial y temporal de estas nodulinas con *RIP*, una peroxidasa, está de acuerdo con la idea de que las modificaciones en la arquitectura de la pared celular, en los sitios donde se localiza el “burst” oxidativo, contribuirían a la reparación y fortificación de la pared. En las interacciones planta-patógeno, es común que se induzcan en simultáneo peroxidasas y proteínas de pared, pues el *cross-linking* limitaría el ingreso del patógeno (Bradley *et al.*, 1992). De la misma forma, en

las interacciones compatibles rizobio-leguminosa, es común el arresto en el avance de muchos hilos de infección.

En *M. truncatula*, la expresión de *RIP1* en el ápice del pelo radical está relacionada con la competencia de esta zona en la asociación simbiótica. Un mutante con un aumento en 10 veces en el número de nódulos presentó un aumento correspondiente en el nivel de transcritos de *RIP1*, mientras que en una no nodulante como *dmi-1*, el nivel de *RIP1* fue prácticamente indetectable (Peng *et al.*, 1996; Ramu *et al.*, 2002). Existen evidencias de que en las primeras fases de la interacción planta-rizobio se inicia un *burst* oxidativo, tal como ocurre en las interacciones planta-patógeno (Bueno *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; Ramu *et al.*, 2002).

Independientemente de los genes que se pueden reconocer como implicados directamente en la organogénesis del nódulo desde el reconocimiento de la señal, hay otros relacionados con funciones colaterales tan importantes como la propia fijación o el aprovechamiento del amonio producido. Tal es el caso de los que codifican la leghemoglobina, de los que participan en la asimilación del amonio producido y liberado por el bacteroide o el transporte del nitrógeno.

Rol de las hormonas en la organogénesis del nódulo

Las hormonas tienen un rol crucial en el proceso de formación del nódulo (Oldroyd, 2007). Un mecanismo sugerido para la inducción de cambios hormonales en las células corticales involucra la producción localizada de flavonoides, que son capaces de inhibir el transporte de auxinas (Wasson *et al.*, 2006). En raíces en contacto con rizobios, se produce una inhibición en el transporte de auxina, lo que provoca su acumulación en el sitio de inoculación, posiblemente estimulando la división de células corticales, dando así lugar a la formación del primordio (Hirsch *et al.*, 1989). Por un mecanismo similar se forman las raíces laterales (en respuesta a una acumulación de auxina) (Mathesius *et al.*, 1998).

El rol de las citoquininas en la simbiosis ha sido sujeto de varios estudios (Frugier *et al.*, 2008). Estas hormonas inducen la división celular, resultando en la formación de un meristema. La aplicación de citoquininas en las raíces de las plantas promueve la formación de nódulos (Bauer *et al.*, 1996). Es más, se ha descrito un mutante ganancia de función en un receptor de citoquinina que forma nódulos espontáneamente (Tirichine *et al.*, 2007). Junto con la auxina, la concentración de citoquinina es elevada durante las primeras etapas de la nodulación, cayendo en nódulos ya maduros. En resumen, auxina y citoquinina, sintetizadas

principalmente en la parte aérea y raíz, respectivamente, son transportadas en la planta, creando un “*landscape*” hormonal temporal y espacial, resultando en una fina regulación de la organogénesis de raíces laterales y nódulos. Probablemente, la infección de los rizobios provoque cambios localizados en la relación entre estas dos hormonas, provocando la inducción de las divisiones corticales (Ferguson & Mathesius, 2003). Asimismo, las giberilinas y brasinoesteroides inducen la formación de nódulos. Mutaciones que provocan una reducción de los niveles de estas hormonas en *Pisum sativum* reducen la nodulación, y la aplicación exógena de giberelinas es capaz de rescatar el fenotipo mutante (Ferguson *et al.*, 2005).

Por su parte, el etileno y los ácidos abscísico, jasmónico (JA) y salicílico (SA) actúan como reguladores negativos de la nodulación. El etileno es otra de las moléculas clave en las interacciones patógeno-planta y *Rhizobium*-leguminosa. El proceso de infección estaría inhibido por etileno en los pasos del *calcium spiking* y formación del IT (Oldroyd *et al.*, 2001; Penmetsa *et al.*, 2003). También participa en la senescencia del nódulo (Sheokand & Brewin, 2003). Por otra parte, sin embargo, el etileno parece proporcionar información posicional al determinar el lugar de aparición de los nódulos en la raíz. El JA de acuerdo a la concentración puede modular o suprimir la frecuencia de los picos de calcio (Nakagawa *et al.*, 2006), e inhibe la nodulación cuando es aplicado exógenamente a las raíces (Ehrhardt *et al.*, 1996).

Otra molécula señal implicada en la simbiosis es el óxido nítrico (NO). La actividad óxido nítrico sintasa se han detectado en nódulos, regulando negativamente su número y la fijación de nitrógeno (Shaw & Long, 2003; Lohar *et al.*, 2007). Para un buen funcionamiento y establecimiento de la simbiosis, el nivel de NO, como el de otros radicales libres del grupo de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), ha de ser controlado, y en este sentido la leghemoglobina puede estar implicada en su inactivación. Además de ser reguladoras del crecimiento, el NO y el JA participan en la activación de mecanismos de defensa contra patógenos, heridas y estrés ambiental.

Etapas tardías de la infección: el proceso de diferenciación

El IT, que se encuentra ramificado a la altura de las células corticales, libera en su interior a las bacterias, mediante endocitosis (Roth & Stacey, 1989; Kijne, 1992). Durante este proceso los rizobios se rodean de una membrana derivada del hospedador conocida como membrana peribacteroidal (MPB) (Robertson & Lyttleton, 1982; Roth *et al.*, 1988; Cheon *et al.*, 1993).

Al compartimento formado *de novo* por bacteroides rodeados de la MPB se lo denomina “simbiosoma” (Roth *et al.*, 1988). En el interior del mismo los rizobios se dividen limitadamente. Los bacteroides rodeados por esta membrana derivada de componentes de la célula vegetal se comportan como un nuevo órgano de la planta y están controlados principalmente por ésta (Mergaert *et al.*, 2006). Los bacteroides en nódulos determinados aumentan de tamaño en comparación con los rizobios de vida libre, mientras que en nódulos indeterminados, sufren cambios morfológicos más notables, como elongación celular y/o adquieren forma de Y. Además, los bacteroides de este último tipo de nódulos, son funcionales pero no viables, ya que no pueden revertir al estado de vida libre una vez liberados al suelo (Sutton & Paterson, 1983; Müller *et al.*, 2001; Mergaert *et al.*, 2006). En los nódulos de tipo indeterminado, la diferenciación terminal de los bacteroides está regulada por factores de la planta, péptidos ricos en cisteína, NCR (*nodule-specific cysteine rich*), producidos por la planta (Van de Velde *et al.*, 2010). En los nódulos de tipo determinado, se desconoce totalmente el mecanismo que regula la proliferación de los bacteroides.

El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo (van de Wiel *et al.*, 1990). Cuando el nódulo se deteriora las bacterias pasan al suelo. En algunos casos las formas bacteroidales no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo.

El nódulo fija nitrógeno atmosférico por un periodo de tiempo determinado, después del cual esta actividad decrece dando lugar a la lisis y, finalmente, a su muerte. Durante la senescencia nodular se presentan una serie de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales que pueden variar entre los nódulos. Dichos cambios están estrechamente relacionados con la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva de la planta (Vance *et al.*, 1986; Swaraj *et al.*, 1996), así como con las condiciones ambientales (estrés) bajo las cuales se cultivan las leguminosas (Vance *et al.*, 1986). Los nódulos de las raíces de las leguminosas se caracterizan por una senescencia temprana, comparada con la senescencia del resto de los órganos de la planta (Evans *et al.*, 1999). Los nódulos senescentes adquieren cambios en la coloración y turgencia, pasando de un color rosado o rojo, debido a la presencia de la leghemoglobina, a un color oscuro ó verde, producto de la conversión de este pigmento en biliverdina.

La asociación simbiótica entre poroto (*P. vulgaris*) y rizobios

El poroto pertenece a la familia *Leguminosae*. Es una especie que se cultiva tanto en el trópico como en zonas templadas. Posee una dotación cromosómica $2n = 22$. Es una planta anual, herbácea y de variada morfología. La producción de poroto tiene múltiples utilidades alimenticias, pudiéndose aprovechar las distintas estructuras de la planta. Se cultiva para la alimentación humana, consumiéndose sus vainas verdes, los granos tiernos o los granos secos.

Diversificación del cultivo de poroto

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en Cali, Colombia, cuenta con la colección de variedades de poroto más completa en América, habiéndose registrado más de 10.000 introducciones. La distribución del poroto es muy amplia en la región americana que se extiende mayoritariamente a lo largo de los Andes. Se han identificado dos grandes centros de diversificación genética, una en Mesoamérica (México, América Central, Colombia) y la otra en la región andina central sudamericana (Perú, Argentina y Ecuador) (Singh *et al.*, 1991; Velásquez & Gepts, 1994; Tohme *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 2001). Esta propuesta ha resultado del análisis de diversos rasgos de las poblaciones de poroto tales como la morfología, tipificación genética de faseolinas, isoenzimas y análisis de RFLP (Gepts, 1990). Se ha propuesto que las poblaciones silvestres de *P. vulgaris* del sur de Ecuador y norte de Perú, representarían las formas ancestrales del poroto a partir de las cuales se dispersaron hacia el norte y sur de América (Kami *et al.*, 1995).

Importancia socioeconómica del cultivo de poroto

El poroto es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano, representando el 50% del consumo mundial de legumbres (McClellan *et al.*, 2004). Según datos de la ONU, la producción mundial es de aproximadamente 23 millones de toneladas, de los cuales 7 se producen en América latina y Africa (<http://www.fao.org/Statistics>). Nuestro país produce aproximadamente 300000 toneladas al año, que se exportan prácticamente en su totalidad. La producción está localizada en el NOA (noroeste argentino, región que está comprendida dentro del centro de domesticación andino de *P. vulgaris*), siendo Salta el principal productor

además de Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero y Catamarca. También tienen participación pero con volúmenes más pequeños Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe y Chaco.

Uno de los principales exportadores mundiales de poroto es China, pero en los últimos años comenzó a recortar la superficie destinada a esa legumbre para derivarla a productos necesarios para abastecer el consumo interno de alimentos. Si bien Argentina produce sólo el 2% del total mundial de poroto seco, se encuentra tercero en el ranking de exportadores, con 15% del total, luego de China (25%) y Estados Unidos (19%). Existen diversas variedades de porotos y cada una de ellas tiene mercados y especificaciones comerciales diferentes: alubia, *cranberry*, *light red kidney*, *argentine red kidney*, negro, etcétera.

Argentina es formadora de precios de porotos alubias a nivel mundial y de porotos negros en el contexto del Mercosur. En esta variedad, Argentina depende fuertemente del mercado brasileño, que absorbe más de la mitad de los volúmenes producidos.

En cambio, en el caso del poroto alubia, las exportaciones anuales pueden ubicarse entre las 120.000 a 130.000 toneladas. Es un producto reconocido en los mercados europeos y asiáticos y cuenta con una calidad que no tiene competencia en el mundo.

Según datos de la SAGPyA, la producción comprendía un 48% de poroto negro y un 43% de alubia en 1996; en 1999 el 65% correspondió al poroto negro y el 28% al Alubia, mientras que, debido a la devaluación en Brasil, la producción de poroto Alubia (46%) superó a la de poroto negro (44%) en el año 2001.

El cultivo de poroto es importante también desde el punto de vista social, ya que en regiones pobres constituye la fuente primaria de proteínas de la dieta, jugando un rol fundamental en la nutrición de las clases sociales más carenciadas (Broughton *et al.*, 2003). Además, representa una fuente de trabajo, ya que la cadena del poroto cuenta con una mano de obra directa de alrededor de 25.000 puestos de trabajo y una mano de obra indirecta de otros 15.000 puestos, durante unos seis meses al año, en una actividad netamente estacional.

Coevolución del poroto en los centros de diversificación

P. vulgaris es considerada una leguminosa promiscua ya que es capaz de formar nódulos con diversos genotipos de rizobios: *Rhizobium etli* bv. phaseoli, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* y *Rhizobium giardini* (Amarger, 2001). La especie *Rhizobium etli* bv. phaseoli es el microsimbionte predominante en porotos silvestres y cultivables en la zona de México, Colombia y los Andes del sur (Montealegre & Kipe-Nolt,

1994; Sessitsch *et al.*, 1997; Amarger, 2001; Bernal & Graham, 2001; Silva *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2004).

Se describieron, además, otros genotipos de rizobios capaces de formar nódulos en condiciones de cultivo de laboratorio del poroto, los cuales están representados por los aislamientos *Rhizobium* sp. T29N3L y T44N22P. A partir del análisis de secuencia del gen 16S rRNA se ha demostrado que dichas cepas se encuentran próximas filogenéticamente a las especies *Agrobacterium rhizogenes* y *Rhizobium tropici* (Aguilar *et al.*, 2006). Además, se ha encontrado que el gen *nodC*, uno de los llamados genes comunes de nodulación y que codifica para una N-acetiltransferasa implicada en el primer paso de ensamblaje de los factores Nod, es polimórfico entre las poblaciones de *R. etli* del NOA (Aguilar *et al.*, 2001). Presenta cuatro perfiles de restricción característicos denominados *nodC* - α , - β , - δ y - γ en poblaciones de *R. etli* representativas de diferentes regiones geográficas americanas. Este gen fue utilizado como marcador molecular para caracterizar la distribución de rizobios presentes en los suelos de los diferentes centros de domesticación del poroto, encontrándose que el genotipo *nodC*- α resultó predominante en la región mesoamericana, mientras que el genotipo *nodC*- δ lo fue en la región de los Andes del sur, del NOA y Bolivia. Además, ensayos de coinoculación revelaron que los genotipos *nodC*- α y *nodC*- δ fueron más competitivos en la nodulación en aquellos porotos provenientes de los respectivos centros geográficos de diversificación (Aguilar *et al.*, 2004).

Genes de poroto expresados específicamente por la infección con cepas del mismo centro geográfico

La correlación entre la predominancia de las bacterias en cada centro de diversificación y la afinidad entre genotipos de poroto y rizobio permitió establecer un sistema experimental para estudiar las bases moleculares de dicha compatibilidad genética. En el curso de los últimos años, nuestro laboratorio ha estado trabajando intensamente en la identificación de genes expresados en raíces de *P. vulgaris* que son funcionales en las etapas tempranas posteriores a la infección con linajes específicos de la especie *R. etli*. Con el propósito de identificar genes diferencialmente expresados en pelos radicales infectados con cepas de rizobio del mismo centro de diversificación, se construyó una biblioteca sustractiva. Para la construcción de la misma, se sustrajo el cDNA obtenido de pelos radicales de Negro Xamapa (cultivar mesoamericano) 24 horas después de la inoculación (hpi) con *R. etli* SC15 (portador del alelo *nodC*- α) con cDNA obtenido 24 hpi con *R. etli* 55N1 (portador del alelo *nodC*- δ). De esta

forma, se identificaron 41 genes (nombrados PvRHS24-01 a -41 por sus siglas *Phaseolus vulgaris* Root Hair Sustraction 24 hours post inoculation, seguido de la numeración correspondiente al contig tentativo) que se activan en respuesta a la infección con el linaje de *R. etli* que predomina en esa misma región geográfica (Peltzer Meschini *et al.*, 2008). A partir de esta anotación, se seleccionaron genes que podrían tener relación con la transducción de señales, mensajeros secundarios y funciones simbióticas para llevar a cabo un análisis detallado de los mismos.

La caracterización funcional de estos genes ha sido abordada haciendo uso de genética reversa, a través del sistema de transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

El estudio de uno de estos genes, que codifica para una GTPasa monomérica Rab, fue recientemente publicado (Blanco *et al.*, 2009). Las raíces con niveles reducidos de la Rab mediante RNA de interferencia (RNAi) no forman nódulos en presencia de *R. etli*. Asimismo, se observó en estas plantas RNAi, la disminución de tanto el número como la longitud de los pelos radicales. Además, se abordó el análisis de otro gen de poroto, que codifica para una subunidad de un factor de transcripción, PvNF-YC. Estudios de expresión llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que los transcritos de PvNF-YC se acumulan temprana (3hpi) y específicamente en el cultivar mesoamericano en respuesta a la cepa de *R. etli nodC- α* , permaneciendo altos tanto en nódulos en desarrollo como en nódulos maduros (Peltzer Meschini *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos del análisis funcional por RNAi y sobre expresión de PvNF-YC sustentan la idea que dicho gen participaría en la regulación de la expresión génica que lleva a una nodulación más eficiente (Zanetti *et al.*, 2010 en prensa).

Se continúa trabajando con estos genes en el laboratorio, y aparte, se comenzó con el estudio de otros genes. En este trabajo de tesis se abordó el análisis de 4 de ellos, con especial énfasis en un gen que codifica para una proteína con alta homología a las denominadas GGAs, asociadas al tráfico vesicular entre el *trans*-Golgi y endosomas. Además, se estudiaron aspectos relacionados a la fisiología de la interacción, y a la molécula señal sintetizada por *R. etli*.

Objetivos

A lo largo de la introducción hemos mencionado y descrito el proceso de simbiosis entre rizobios y leguminosas, y sus principales actores. El proceso es complejo, con múltiples etapas secuenciales que requieren efectores y respuestas de ambos simbioses. La información disponible revela cierta complejidad natural, y a pesar de que se han logrado avances muy importantes en aspectos moleculares, aún se identifican puntos débiles, los cuales deben ser determinados.

La competencia por la nodulación es uno de los aspectos de la interacción con interés básico y aplicado, y que merece ser estudiado para comprender cuáles son los mecanismos funcionales en aquellas combinaciones de leguminosas y cepa de rizobio que resultan en plantas mejor noduladas y más eficientes en la fijación de nitrógeno. En particular, los factores de la planta leguminosa que son importantes para determinar grados de afinidad con el microsimbionte, no han sido debidamente explorados.

En este trabajo de tesis se utilizó el sistema *P. vulgaris-R. etli* como modelo para investigar la afinidad entre porotos pertenecientes a los centros de diversificación de Mesoamérica y de la región Andina sureña y los rizobios de esas regiones.

Teniendo en cuenta los eventos que se desarrollan desde el inicio del diálogo molecular hasta la formación del nódulo fijador de nitrógeno, el presente trabajo de tesis pretende contribuir al conocimiento de la interacción entre genotipos de poroto y rizobios que coevolucionaron en el mismo centro geográfico. En este sentido, se plantearon los siguientes objetivos generales:

- 1) Estudio de los aspectos fisiológicos de la interacción de dos cultivares de poroto representativos de los pools genéticos Mesoamericano y Andino, en respuesta a la infección con cepas de *R. etli* predominantes en estas regiones caracterizadas por los alelos *nodC- α* y *nodC- δ* .
- 2) Determinación de la estructura de la molécula señal de nodulación sintetizada por los linajes *nodC- α* y *nodC- δ* de *R. etli*.
- 3) Análisis funcional y de expresión de genes identificados en la biblioteca substractiva de poroto, que se activan en respuesta a la infección con la cepa más competitiva.

Capítulo 1

Caracterización de aspectos fisiológicos de la simbiosis implicados en el reconocimiento específico de cultivares y linajes de rizobio

La interacción simbiótica comprende una sucesión de etapas que transcurren ordenadamente desde el momento en el cual la leguminosa hospedadora percibe al rizobio compatible. La formación de un nuevo órgano radical –el nódulo– que resulta ocupado por las bacterias es la culminación del proceso que resulta funcionalmente activo en fijación de nitrógeno molecular. En particular, en la asociación poroto-rizobio, la especie *R. etli* predomina en la nodulación de *P. vulgaris* en las Américas, donde a su vez se han identificado dos centros de domesticación del hospedador (Aguilar *et al.*, 2004). Los porotos de cada región presentan una marcada afinidad por los rizobios presentes en el suelo (Aguilar *et al.*, 2004). Esta característica de la asociación poroto-rizobio ha resultado de analizar en experimentos de coinoculación los rizobios contenidos en nódulos maduros.

Con el objetivo de caracterizar la/s etapa/s de la interacción entre plantas de poroto y cepas de rizobio en las que se establece la relación preferencial con cepas de la misma región geográfica, se realizaron ensayos para estudiar los estadios tempranos de la interacción. Estos estudios permitirían evaluar si la afinidad se manifiesta tempranamente a la formación de nódulos maduros.

Este estudio lo abordamos desde el análisis de las respuestas fisiológicas y morfológicas de la planta hasta el de las respuestas moleculares a la infección con rizobios.

Con este propósito se encararon los siguientes experimentos:

- I. Análisis del curso temporal de nodulación en raíces de poroto andino y mesoamericano con distintos genotipos de rizobios;
- II. Comparación de la formación de hilos de infección en cada una de las combinaciones de planta hospedadora con linaje de rizobio;
- III. Evaluación del efecto de la simbiosis sobre el crecimiento de la parte aérea de la planta de poroto mediante la determinación de materia seca;
- IV. Evaluación del tamaño del nódulo formado en raíces de variedades de poroto mesoamericano y andinos inoculadas con las cepas representativas de las cepas de rizobios predominantes en suelos mesoamericanos y andinos;
- V. Evaluación de las respuestas moleculares tempranas de la planta por *qRT-PCR*.

Variedades de poroto y cepas de rizobios empleadas en los ensayos

Los estudios que se describen en las secciones que siguen, fueron realizados con las variedades de poroto Nag12 y Alubia, que hemos tomado como representativos de los respectivos centros de diversificación mesoamericano y andino (**Figura 1.1**). Los ensayos de inoculación se llevaron a cabo con cepas de *R. etli* pertenecientes a los linajes *nodC- α* y *nodC- δ* .

El crecimiento de las plantas en el laboratorio se llevó a cabo en cámaras de cultivo con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, para minimizar los posibles efectos de cambios en las condiciones ambientales.



Figura 1.1. Semillas de poroto usadas en los ensayos de nodulación. A la izquierda (A), semillas de poroto negras de la variedad Mesoamericana Nag12. En (B), semillas blancas de la variedad Andina Alubia.

Patrón temporal de nodulación

Las cepas de *R. etli* usadas en los ensayos de nodulación fueron 4 cepas *nodC- α* (SC15, CFNX5, 136N3 y 138N1) y 4 cepas *nodC- δ* (55N1, 136N2, 1373 y 152N3). Para facilitar la observación periódica del aparato radical y la aparición de nódulos, las plantas fueron crecidas en *pouches* (**Figura 1.2**). Los nódulos se cuantificaron desde el momento de aparición (estadio de primordios) hasta los 7-8 días post inoculación. En las tablas suplementarias 1.1 y 1.2 se detallan los valores obtenidos.

Los nódulos formados en las raíces Nag12 infectadas por cepas *nodC- α* (SC15, CFNX5, 136N3 y 138N1) aparecieron a los 4 dpi, en número de entre 3 y 10 nódulos por planta. A los 7 dpi no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (Anova seguido de Tukey, $P < 0,05$) en el número de nódulos formados por cada una de las cepas, a excepción de la cepa 138N1, que superó ampliamente al resto en el número de nódulos formados.



Figura 1.2. Sistema empleado para crecer las plantas de poroto en las cinéticas de nodulación. El dispositivo de “pouches” permitió la inspección periódica del sistema radical sin perturbar el sistema. Cada una de las plantas se inoculó con una suspensión de 5 ml de cultivo de rizobio en fase de crecimiento exponencial. Las plantas de la imagen corresponden a plántulas de poroto de la variedad mesoamericana Nag12, 5 días luego de transferir las semillas germinadas a *pouches*, momento en el cual se realizó la inoculación.

En las raíces inoculadas con las cepas del linaje *nodC*- δ , los nódulos aparecieron también al cuarto día, pero en menor número, de 1 a 3 por planta (**Figura 1.3**, Panel B). Dos de estas cepas, 55N1 y 152N3, se diferenciaron de las restantes *nodC*- δ por su menor eficiencia en formación de nódulos a los 7 dpi (Anova seguido de Tukey, $P < 0,05$) (**Figura 1.3**).

Un análisis comparativo permitió distinguir diferencias significativas entre dos cepas *nodC*- α , SC15 y CFNX5, respecto de las 4 cepas del linaje *nodC*- δ , mientras que el número de nódulos formados por las restantes cepas 136N3 y 138N1 del linaje *nodC*- α sólo fue significativamente mayor que los formados por las cepas 55N1 y 152N3.

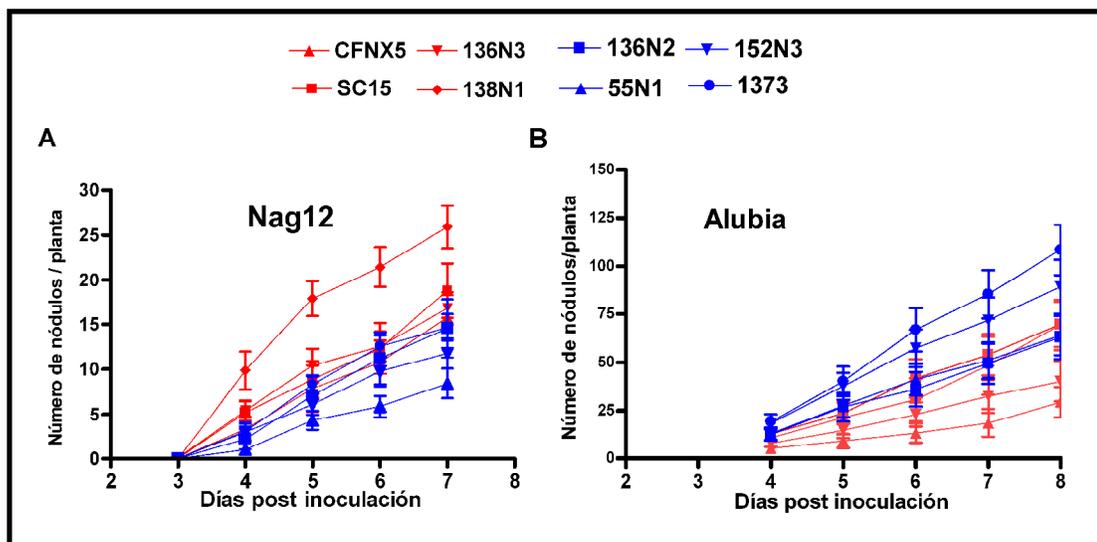


Figura 1.3. Patrón temporal de nodulación comparado de las dos variedades de poroto. En los paneles A y B se representaron las curvas de nodulación de la variedad Nag12 y Alubia, respectivamente, con las 8 cepas de *R. etli* evaluadas. Las curvas en color rojo corresponden a las 4 cepas pertenecientes al linaje *nodC*- α , y en azul a las *nodC*- δ .

Las raíces de la variedad Alubia inoculadas con las cepas *nodC*- δ desarrollaron entre 12-19 nódulos por planta a los 4 dpi. A los 8 dpi, no se observaron diferencias significativas entre las cepas de este grupo. Las raíces infectadas con las cepas *nodC*- α también formaron nódulos a los 4 dpi, en número de 5-13 por planta, y tampoco se observaron diferencias significativas entre estas cepas.

Se realizó un análisis comparativo del número de nódulos formados por ambos linajes, que permitió distinguir diferencias significativas sólo de las cepas 1373 y 152N3 de las cepas *nodC*- α .

El análisis de los resultados obtenidos en Alubia indica que en esta variedad el número final de nódulos es muy superior al alcanzado en Nag12. Estos ensayos con variedades mesoamericanas y andinas no se realizaron en paralelo, y las diferencias en las tasas de nodulación alcanzadas podrían atribuirse a diferencias intrínsecas entre las variedades con una respuesta distinta a la inoculación.

En promedio, en Nag12 a los 7 dpi, la inoculación con las cepas de los linajes *nodC*- α y *nodC*- δ resultó en la formación de $19,31 \pm 4,56$ y $12,36 \pm 2,93$ nódulos, respectivamente. En Alubia, con las cepas de los linajes *nodC*- α y *nodC*- δ se formaron $38,43 \pm 8$ y $64,51 \pm 8,62$ nódulos, respectivamente. Estos valores se analizaron mediante un *t-test* ($P < 0,05$), resultando significativas las diferencias en ambos casos.

La evaluación del patrón temporal de nodulación ha mostrado que las cepas que provienen del mismo centro geográfico de diversificación que el hospedador son más eficientes en la nodulación, ya que el mayor número de nódulos se alcanzó en las plantas de poroto inoculadas con las cepas provenientes del mismo origen geográfico.

Patrón temporal de formación de hilos de infección

En un escenario rizosférico que pone a la planta hospedadora frente a una diversidad de rizobios compatibles, sólo el/los más competitivos lograrán ocupar los nódulos de la planta. El progreso exitoso de los hilos de infección hacia las células corticales que se encuentran en división es un determinante importante del número de nódulos que se forman finalmente en las raíces de las plantas (Pierce & Bauer, 1983; Suzuki *et al.*, 2008; Dongxue *et al.*, 2009).

En los ensayos de inoculación de poroto con una suspensión compuesta por iguales proporciones de cepas *nodC*- α y *nodC*- δ , se observa una clara afinidad del hospedador por

uno u otro genotipo, fenómeno que resulta más evidente en la variedad mesoamericana (Aguilar *et al.*, 2004).

Nuestra hipótesis sobre esta respuesta diferencial asume que ya en etapas tempranas de la interacción se manifiesta la mayor afinidad entre porotos y cepas de una misma región de diversificación del hospedador. En el contexto de esta hipótesis examinamos la formación de hilos de infección (IT) en el curso del tiempo, y en plantas coinoculadas con mezclas de dos cepas pertenecientes a los alelos *nodC-α* y *nodC-δ*, respectivamente. Para facilitar la visualización microscópica de hilos de infección se usaron cepas marcadas con genes reporteros que expresan las proteínas fluorescentes verde y roja. Se usaron dos combinaciones de cepas para la coinoculación: 1) CFNX5-DsRed (*nodC-α*) + 55N1-GFP (*nodC-δ*), y 2) CFNX5-DsRed + 136N2-GFP (además de las mezclas CFNX5-GFP + 55N1-DsRed y CFNX5-GFP + 136N2-DsRed). Las raíces fueron examinadas mediante microscopia de fluorescencia, a las 12, 24, 48 hs y luego de 4 y 5 dpi. Se cuantificaron los IT observados en 10 porciones de raíz de aproximadamente 1 cm de longitud cada una, correspondientes a dos muestras biológicas por tratamiento. No se observó formación de IT a las 12 y 24 hpi en los dos cultivares ensayados var. Nag12 y Alubia, respectivamente. Sin embargo, se observaron bacterias adheridas predominantemente a la superficie de ápice de los pelos radicales, formando microcolonias (**Figura 1.4**).

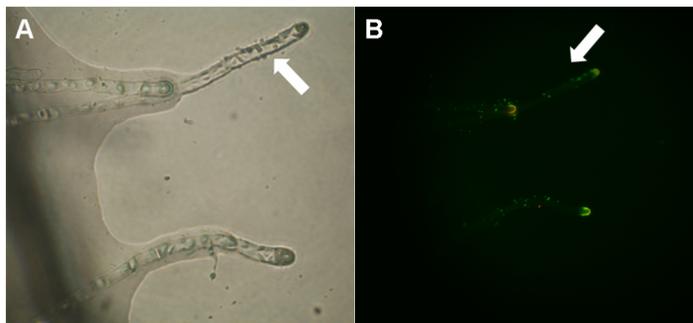


Figura 1.4. Formación de micro colonias de rizobios en los pelos radicales de poroto. Imágenes adquiridas con cámara digital Olympus acoplada a un microscopio de fluorescencia. Raíces de poroto variedad Alubia 24 hspi con una mezcla de 55N1-GFP y CFNX5-DsRED. Panel A, Imagen tomadas con luz visible. Panel B, el mismo campo que A, iluminada con luz UV. Las flechas indican las bacterias en el ápice de los pelos.

En la **Figura 1.5** se pueden observar imágenes de IT, adquiridas con el microscopio.

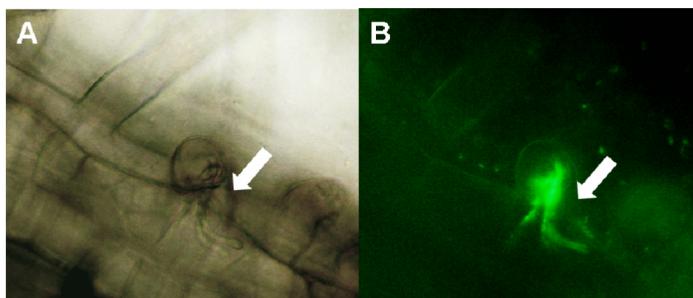


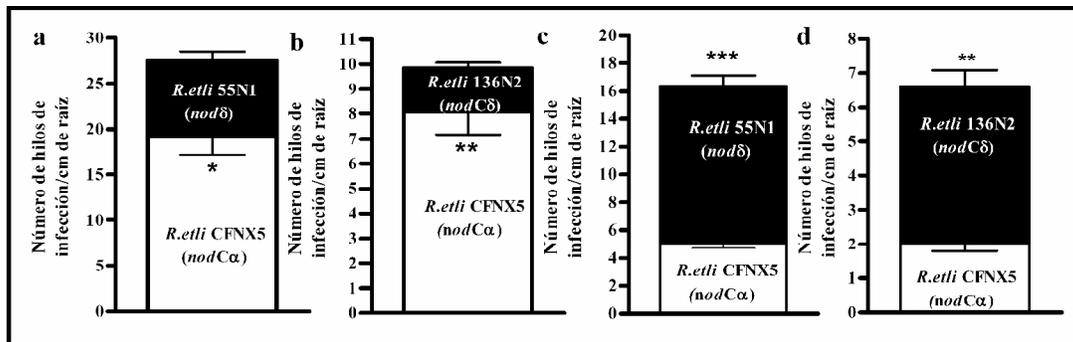
Figura 1.5. Observación de IT en raíces de la variedad Alubia 4 dpi. A. Hilo de infección (IT) en desarrollo formado en raíces Alubia coinoculadas con CFNX5-DsRED y 55N1-GFP. La flecha indica el hilo de infección ramificado. La imagen fue adquirida con luz visible (A) o luz UV utilizando filtros para GFP (B).

A las 48 hpi de la variedad Nag12 se observaron hilos de infección con fluorescencia roja pero no verde, lo cual indicó que la cepa CFNX5-DsRED fue capaz de colonizar el pelo radical, e iniciar y extender los IT formados. Se contaron 8 ± 0.7 IT por cm de raíz. Se observó la misma tendencia cuando se inoculó CFNX5-DsRed junto a 136N2-GFP, sólo se observaron hilos de infección rojos (6 ± 0.7). Los resultados obtenidos indicarían que la cepa *nodC-α* es capaz de establecer una infección precoz de las raíces de la variedad Nag12.

En Alubia, se observaron IT recién a los 4 dpi. Los IT formados se cuantificaron a los 5 dpi, y se compararon con los formados en Nag12 a los 4 dpi (**Figura 1.6**).

En el análisis de competencia en la variedad andina se observó que las cepas del linaje *nodC-δ* 55N1 y 136N2 formaron un número de IT significativamente superior que la cepa *nodC-α* CFNX5 (**Figura 1.6, c y d**).

La precocidad en formación de IT en la variedad Nag12 está en concordancia con el patrón temporal de nodulación que fuera descrito previamente.



Se obtuvo la misma tendencia en los ensayos de coinoculación en los que se empleó la cepa *nodC-α* marcada con la proteína GFP. Este control se realizó para descartar un posible efecto del plásmido sobre los resultados de competencia.

Estos experimentos de coinoculación demuestran que las cepas *nodC-α* y *-δ* marcadas con proteínas fluorescentes son capaces de colonizar e iniciar la formación y extensión de IT en raíces de poroto pertenecientes a los dos pools de domesticación. Sin embargo, se observaron variaciones en la cantidad y en el tiempo de aparición de IT. La precocidad de la formación de estas estructuras indicaría que la interacción variedad de poroto x linaje de

rizobio se manifiesta en etapas muy tempranas y que acompaña al resultado de ocupación de nódulos que se observa en el curso ulterior del proceso simbiótico.

Evaluación de la de la acumulación de materia seca en plantas como indicador de la eficiencia simbiótica

Con el propósito de evaluar si el mayor número de nódulos formados en las interacciones de mayor afinidad está asociado a una mayor eficiencia en la FBN, se determinó el nivel de materia seca en la parte aérea de la planta a los 30 dpi. Este análisis se realizó con porotos pertenecientes a los pooles genéticos mesoamericano y andino, inoculados con las mismas cepas de *R. etli* empleadas en la cinética de nodulación.

Se incluyeron dos grupos de plantas control en el ensayo: un grupo de plantas no inoculadas y regadas con solución mineral Fahraeus; y otras regadas con solución mineral

Fahraeus suplementado con nitrato. La vermiculita usada para el crecimiento de las plantas es un soporte inerte, que al igual que la solución de riego, no aporta nutrientes nitrogenados, por lo que las plantas dependen de la FBN para su crecimiento una vez agotadas las reservas de los cotiledones de las semillas.

Los resultados se muestran en la **Figura 1.7** (los datos primarios se encuentran en la tabla suplementaria 1.3). Las plantas regadas con una fuente de nitrógeno fueron las que mostraron los valores más altos de materia seca acumulada en la parte aérea, en oposición a lo observado en las plantas que no recibieron ninguna fuente de nitrógeno.

En la variedad Nag12 (**Figura 1.7, a**), la acumulación de materia seca fue superior en las plantas inoculadas con las cepas *nodC- α* comparadas con las inoculadas con cepas *nodC- δ* . Se realizó un test de Tukey para evaluar si las diferencias en el valor de materia seca alcanzada entre los diferentes tratamientos resultan significativas. En Nag12, esta diferencia fue significativa entre los tratamientos con CFNX5 y 1373 ($P < 0.01$), pero no con el resto de las cepas empleadas ($P > 0.05$). La suplementación con nitrógeno en la solución de riego resultó el tratamiento más efectivo, comparable al alcanzado con las plantas inoculadas con la cepa CFNX5. El rendimiento alcanzado con las dos cepas genotipo *nodC- δ* 55N1 y 1373 no difirió del tratamiento control de plantas limitadas en nitrógeno.

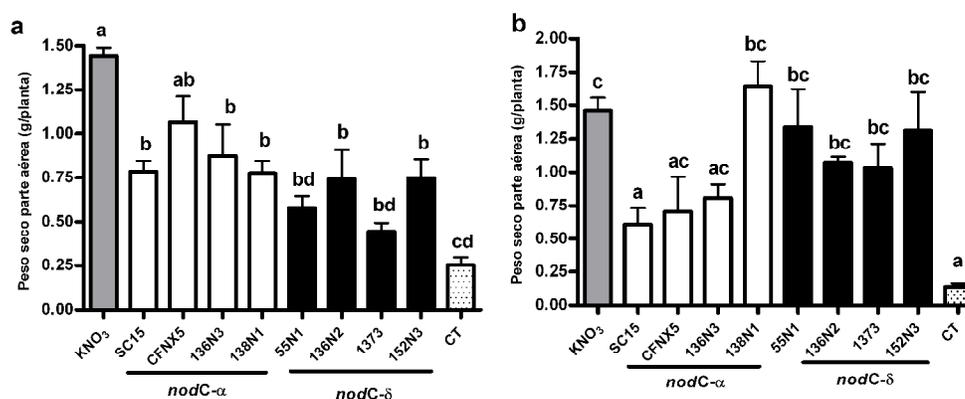


Figura 1.7. Evaluación de peso seco de la parte aérea en plantas de poroto inoculadas con cepas de *R. etli* pertenecientes a los linajes *nodC-α* y *δ*. En el panel **a** se muestra la acumulación de materia seca para la variedad Mesoamericana Nag12 y en **b**, para la Andina Alubia. Las barras representan el valor promedio de 5 plantas por tratamiento (\pm SD). Letras distintas encima de las barras indican diferencias significativas (ANOVA seguido de Tukey, $P < 0.05$).

El análisis de los resultados obtenidos en la variedad Andina (**Figura 1.7, b**) reveló una marcada diferencia entre las plantas control sin nitrógeno y el resto de los tratamientos, sin embargo, el análisis estadístico de Tukey no arrojó diferencias significativas entre el rendimiento de la parte aérea alcanzado en plantas sin nitrógeno y las inoculadas con las cepas *nodC-α* SC15, CFNX5 y 136N3. Contrariamente a lo observado con Nag12, las plantas tratadas con nitrato sólo presentaron diferencias significativas con el control sin nitrógeno y las inoculadas con la cepa SC15. Además, sólo las plantas inoculadas con la cepa 138N1, dentro del grupo de rizobios con genotipo *nodC-α*, acumularon materia seca comparable a las del control regado con KNO₃. La infección con el resto de las cepas de este linaje resultó en una menor acumulación de materia seca.

Con el propósito de reducir los efectos de la variabilidad propia del material vegetal utilizado, se evaluaron los mismos datos de materia seca, considerándolos en grupos que comprenden a los valores provenientes de todas las plantas inoculadas con las cepas del linaje *nodC-α* por un lado, y a todas las plantas inoculadas con las cepas *nodC-δ* por el otro (Tabla 1.4 suplementaria).

En promedio, la materia seca acumulada por la variedad Nag12 inoculada con las cepas *nodC-α* fue significativamente superior en comparación con las cepas *nodC-δ*. Ninguno de los dos tratamientos resultó tan eficiente como el control suplementado con KNO₃ (**Figura 1.8, A**), pero superaron al control sin nitrógeno. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas de Alubia y las regadas con nitrato. En promedio, las cepas pertenecientes al linaje *nodC-α* no se diferenciaron del peso seco acumulado en

plantas control sin inocular. En Alubia, las diferencias en el valor de materia seca acumulada en plantas inoculadas con cepas del linaje *nodC*- δ y *nodC*- α no fueron significativas. La materia seca acumulada en las plantas control sin nitrógeno fue significativamente inferior que las inoculadas con cepas del linaje *nodC*- δ y las regadas con una nitrato, pero no de las inoculadas con cepas del linaje *nodC*- α .

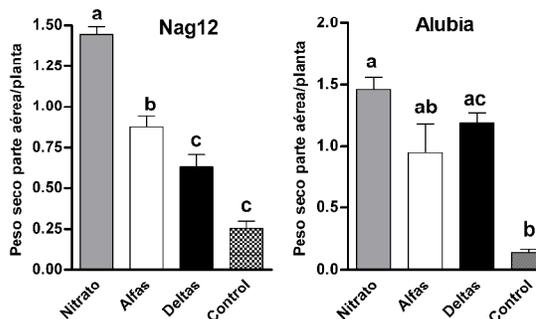


Figura 1.8. Peso seco promedio por planta alcanzado en las variedades Nag12 y Alubia. Las barras representan los valores resultantes de promediar los valores de materia seca de todas las plantas inoculadas con cepas del linaje *nodC*- α y *nodC*- δ , respectivamente. Se realizó un ANOVA unidireccional, seguido de Tukey para análisis de medias ($P < 0.05$).

Estos resultados indicarían que es con las cepas del mismo centro de diversificación que el hospedador que se alcanza un mayor desarrollo de la parte aérea, lo que en términos prácticos podría representar un mayor rendimiento del cultivo.

Evaluación del tamaño del nódulo formado por las variedades Nag12 y Alubia en simbiosis con cepas simpátricas y alopátricas

Con el propósito de evaluar si el tamaño de los nódulos presenta alguna correlación con la afinidad de la interacción que fue descrita en las secciones anteriores, realizamos ensayos de inoculación de poroto Nag12 y Alubia con las cepas SC15 y 55N1, respectivamente. Los nódulos fueron cosechados a los 30 dpi para la determinación del tamaño.

En la **Figura 1.9** se muestran los valores del tamaño promedio de los nódulos formados en 5 plantas por cada uno de los tratamientos. El diámetro promedio de los nódulos formados en raíces Nag12 infectada con las cepas SC15 y 55N1 fue de 1.6 y 1.39 mm, respectivamente. En Alubia, en cambio, los nódulos desarrollados en raíces infectadas con la cepa 55N1 alcanzaron un diámetro promedio de 1.41 mm, mientras que con SC15, de 1.16 mm. Estos resultados demuestran que la asociación entre porotos y rizobios simpátricos da lugar a nódulos de mayor tamaño que aquellos formados con cepas alopátricas.

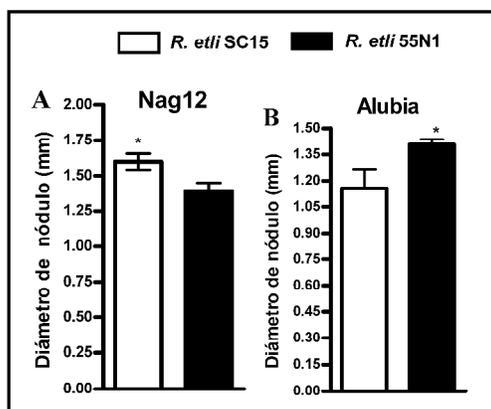


Figura 1.9. Efecto del linaje de rizobio sobre el tamaño promedio del nódulo formado en las variedades Nag12 (A) y Alubia (B). Los datos resultaron de medir el diámetro de aproximadamente 215 nódulos de 30 días de edad por cada tratamiento de entre 4 y 5 plantas cada uno. Los desvíos estándar corresponden a 5 réplicas biológicas. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas (*t-test*, $P < 0,05$).

☑ **Estudio de la expresión de genes marcadores de la nodulación en el contexto de la interacción variedad poroto x linaje de rizobio**

Desde las etapas tempranas de la interacción simbiótica se da una sucesión de eventos coordinados espacial y temporalmente que transcurren durante la infección y formación del nódulo. Según Van Kammen (1995), cada una de las fases sucesivas de la formación del nódulo radical está asociada a la expresión de genes de la planta, específicos de la nodulación, que codifican las proteínas llamadas nodulinas.

Los resultados presentados anteriormente sobre la formación de IT sugieren respuestas diferentes de la planta a la inoculación con los genotipos *nodC-δ* y *nodC-α* de *R. etli*. Es probable que esta respuesta diferencial se manifieste en etapas aún más tempranas que aquellas en que se visualizan cambios morfológicos en la raíz, tales como formación de IT y activación del meristema cortical. Para poner a prueba esta posibilidad, caracterizamos los eventos moleculares tempranos de la planta en respuesta a la infección con cepas representativas de los genotipos *nodC-δ* y *nodC-α*.

Las etapas iniciales del reconocimiento entre la raíz y el rizobio comprenden la percepción de los NF producidos por los rizobios, señal que dispara una vía de transducción de señales y la activación de la expresión de los genes codificantes de nodulinas. Además, la formación del nódulo implica la activación de la división de las células corticales que darán lugar al primordio nodular. Se ha demostrado la activación de genes involucrados en la transición G₂/M tales como *CICLINA B* y *CDC2* en respuesta a la aplicación de NF y a la inoculación con rizobios (Savoure *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994).

Los genes codificantes de nodulinas y los relacionados al ciclo celular evaluados en esta sección comprenden:

- **ENOD40**, consiste en una molécula de RNA de aproximadamente 700 bp, cuya secuencia contiene pequeños marcos de lectura que codifican péptidos putativos de 10 a 12 aa. Se especula que puede actuar como RNA, ya que contiene una región 3'UTR conservada capaz de formar estructuras secundarias estables, o bien que estos pequeños péptidos se sintetizan y lleven a cabo su actividad biológica. Su expresión es esencial para la formación del primordio (Yang *et al.*, 1993; Crespi *et al.*, 1994; Charon *et al.*, 1997; Campalans *et al.*, 2004). Se expresa durante la formación del primordio, y, durante la diferenciación del nódulo, en el meristema, la zona de infección y los haces vasculares (Kouchi & Hata, 1993; Yang *et al.*, 1993; Crespi *et al.*, 1994; Corich *et al.*, 1998; Fang & Hirsch, 1998; Mathesius *et al.*, 2000; Varkonyi-Gasic & White, 2002). Su inducción ocurre primero en las células del periciclo, y luego en las células corticales en división y células en diferenciación del primordio (Crespi *et al.*, 1994; Gamas *et al.*, 1996; Fang y Hirsch, 1998).
- **ERN**, (del inglés: *ERF Required for Nodulation*) un factor de transcripción tipo AP2 necesario para la formación del IT e invasión del nódulo (Middleton *et al.*, 2007).
- **RIP**, (del inglés *Rhizobium-induced peroxidase*) es una peroxidasa que se induce tempranamente durante la nodulación (Cook *et al.*, 1995, Peng *et al.*, 1996). Se expresa en el primordio y en los pelos radicales (Bauer *et al.*, 1997; Terada *et al.*, 2001).
- **NF-YC**, correspondiente a la subunidad C de un factor de transcripción heterotrimérico CCAAT, que fuera identificado en la biblioteca substractiva de pelos radicales de poroto (Peltzer Meschini *et al.*, 2008). En nuestro laboratorio se ha demostrado que *NF-YC* se induce en las variedades mesoamericanas Nag12 y Negro Jamapa en respuesta a la inoculación con rizobios pertenecientes al linaje *nodC-α* (Zanetti *et al.*, 2010) y participaría en la vía de transducción de señales que conduce a una nodulación eficiente en los porotos mesoamericanos.
- **CICLINA B**, está asociada a la división celular en plantas (Mironov *et al.*, 1999), y presenta el máximo de expresión durante la transición G2-M. Se activa en las células corticales internas de raíces inoculadas con rizobios (Yang *et al.*, 1994).
- **CDC2**, es una quinasa, perteneciente al grupo de proteínas denominadas *CDKs* (del inglés *Cyclin Dependent Kinases*), que es activa sólo cuando se asocia a las ciclinas (Yang *et al.*, 1994).

Los niveles de expresión fueron determinados por *qRT-PCR*. El análisis de la significancia de las diferencias en el nivel de expresión entre las muestras se realizó mediante un análisis estadístico del tipo *t-test* ($P < 0,05$).

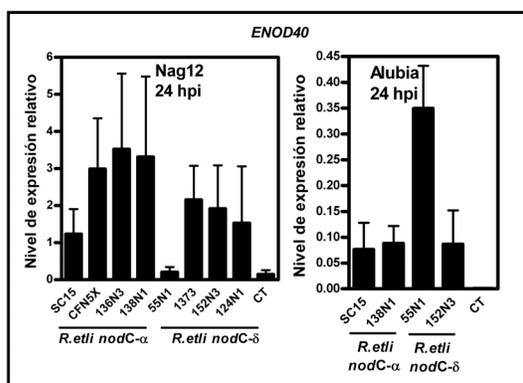


Figura 1.10. Niveles de transcritos de *ENOD40* en raíces de poroto variedades Nag12 y Alubia 24 hpi determinados por *qRT-PCR*. En Nag12, a las 24 hpi, se evaluaron 4 cepas *nodC-α* y 4 cepas *nodC-δ*, en 4 muestras biológicas (\pm SD). En Alubia se evaluaron 2 muestras biológicas (\pm SD). Los valores se normalizaron con *EF-1α*. Las plantas control fueron inoculadas con medio de cultivo YEM.

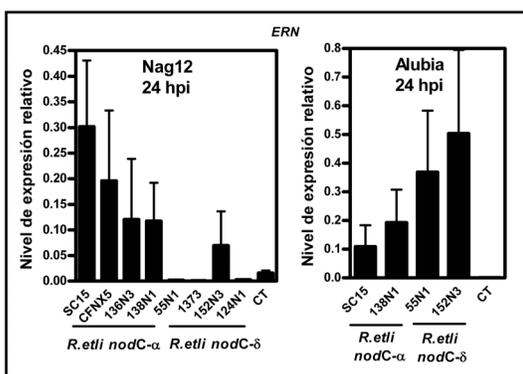


Figura 1.11. *qRT-PCR* de la nodulina *ERN* en raíces de poroto variedades Alubia y Nag12 24 hpi. En Nag12, a las 24 hpi, se evaluaron 4 cepas *nodC-α* y 4 cepas *nodC-δ*, en 4 muestras biológicas (\pm SD). En Alubia se evaluaron 2 muestras biológicas (\pm SD). Los valores se normalizaron con *EF-1α*. El control fue inoculado con medio de cultivo YEM.

El análisis de la expresión de *ENOD40* en Nag12 (**Figura 1.10**) mostró un aumento en los niveles de mRNA en todos los tratamientos, excepto en las raíces inoculadas con la cepa 55N1. Asimismo, la expresión fue superior en las raíces inoculadas con las cepas *nodC-α* comparadas con las *nodC-δ*, pero como los desvíos en el nivel de expresión fueron elevados, no se puede concluir que tales diferencias son significativas. En Alubia se pudo observar un aumento en la expresión como resultado de la infección con todas las cepas comparadas con el CT (YEM), resultando más claramente con la cepa 55N1.

En la **Figura 1.11** se muestra el resultado de analizar la expresión de *ERN*. En Nag 12 se evaluó el efecto de la inoculación con 4 cepas *nodC-α* y 4 cepas *nodC-δ*. En general, los niveles de transcritos aumentaron luego de la infección con las 4 cepas *nodC-α*. En el caso de las cepas *nodC-δ* se observó activación superior al control sólo con la cepa 152N3. En comparación se obtuvo una diferencia de casi 10 veces en el nivel de expresión con los dos linajes de rizobios, siendo las cepas *nodC-α* las más eficientes en la inducción de los niveles de expresión de *ERN*. En Alubia, se observaron niveles de expresión mayores respecto al control, en el que no se detectó acumulación de transcritos. La comparación de los niveles de expresión alcanzados con ambos genotipos de rizobios revela que el promedio entre las

cepas *nodC*- δ fue casi 3 veces superior al de las cepas *nodC*- α .. En particular, la cepa 152N3 fue la más efectiva en la activación de ERN.

Estos datos sugieren que el hospedador reconoce las cepas más eficientes, en el que se pone de manifiesto la activación diferencial del factor de transcripción.

El estudio de expresión de *RIP* se muestra en la **Figura 1.12**. En Nag12, se detectaron niveles significativos de acumulación con todas las cepas ensayadas respecto a las plantas control. En Alubia se observó acumulación de transcritos por encima de control sólo con las cepas SC15 y 55N1, siendo esta última más eficiente en la activación de la expresión de *RIP*. Estos resultados indican que a diferencia de lo observado en el análisis de *ENOD40* y *NF-YC*, la expresión de *RIP* no presenta una correlación con la cepa de rizobio usada para inocular. Los resultados obtenidos en el análisis de expresión de *NF-YC* se muestran en la **Figura 1.13**.

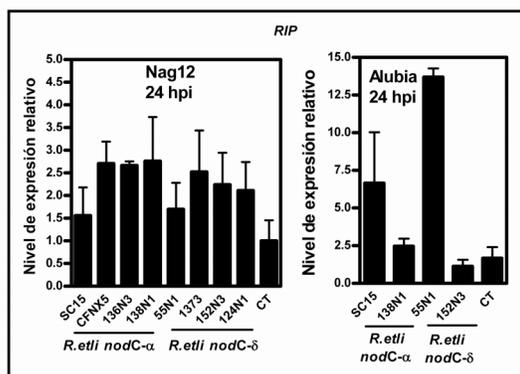


Figura 1.12. qRT-PCR *RIP* en raíces de poroto variedades Alubia y Nag12 24 hpi. En Nag12, a las 24 hpi, se evaluaron 4 cepas *nodC*- α y 4 cepas *nodC*- δ , en 4 muestras biológicas (\pm SD). En Alubia se evaluaron 2 muestras biológicas (\pm SD). Los valores se normalizaron con *EF-1 α* . El control fue inoculado con medio de cultivo YEM.

La **Figura 1.13** muestra los resultados obtenidos en el análisis de expresión de *NF-YC*.

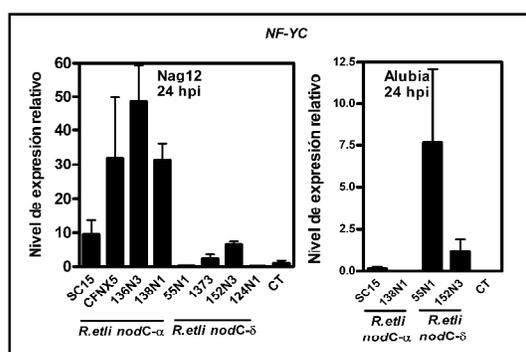


Figura 1.13. qRT-PCR de *NF-YC* en raíces de poroto variedades Alubia y Nag12 24 hpi. En Nag12, a las 24 hpi, se evaluaron 4 cepas *nodC*- α y 4 cepas *nodC*- δ , (\pm SD de 4 muestras biológicas). En Alubia se evaluaron 2 muestras biológicas (\pm SD de 2 muestras biológicas). Los valores se normalizaron con *EF-1 α* . El control fue inoculado con medio de cultivo YEM.

Los niveles de transcritos de *NF-YC* en Nag12 fueron 10 a 50 superiores en raíces infectadas con cepas de *R. etli* del linaje *nodC*- α comparados con las raíces no inoculadas, mientras que fue prácticamente nula la acumulación de transcritos luego de la inoculación con cepas

nodC-δ. Estos resultados indican que *NF-YC* es activado positivamente por las cepas *nodC-α* de *R. etli*, las cuales son más competitivas.

Se puede concluir que la activación en poroto de genes relacionados con la nodulación, presenta patrones diferentes de acuerdo a la variedad de poroto y al genotipo de rizobio. En general, este patrón acompaña a la afinidad hospedador x linaje de *R. etli*.

Activación de genes que participan en la regulación del ciclo celular durante la simbiosis

También se analizó el patrón de expresión de genes que regulan el control de la división del ciclo celular, más específicamente en la transición de G_2 a mitosis (*CICLINA B* y *CDC2*). Los transcritos de estos dos genes se cuantificaron por *qRT-PC*. En la **Figura 1.14** se muestran los resultados de la cuantificación de *CICLINA B* en las variedades Nag12 y Alubia inoculadas con SC15 y 55N1 a las 12 y 24 hpi. Las diferencias más significativas se obtuvieron con el cultivar mesoamericano a las 24 hpi, tiempo en el cual la acumulación de transcritos en respuesta a la cepa simpátrica SC15 fue significativamente superior al alcanzado con la cepa 55N1. En Alubia en cambio, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los dos tiempos de medición.

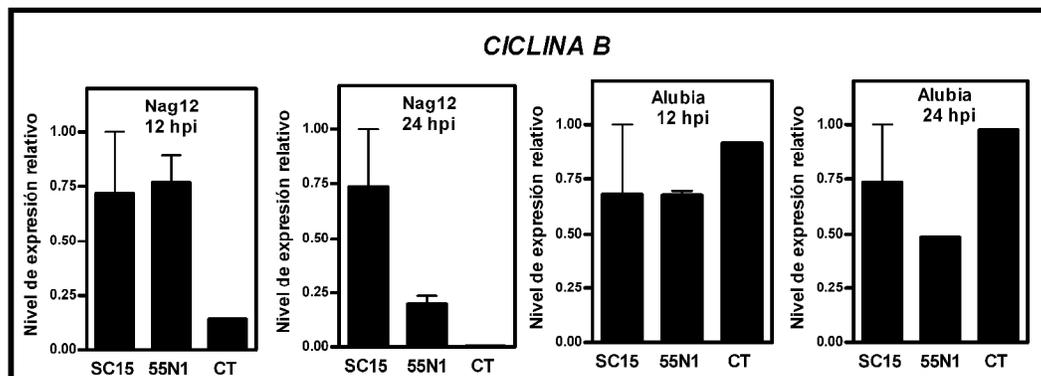


Figura 1.14. *qRT-PCR* de *CICLINA B* en raíces de poroto Nag12 y Alubia. A las 12 y 24 hs post-inoculación se cosecharon las raíces inoculadas con cultivos de SC15 ó 55N1, como cepas representativas de los linajes *nodC-α* y δ . Los desvíos estándar corresponden a dos réplicas técnicas de una muestra biológica. Los datos se normalizaron por *EF-1α*.

Estos resultados indicarían que la activación de las primeras divisiones corticales ocurre de forma más marcada con la cepa SC15 en el cultivar mesoamericano. Asumiendo que la activación de *CICLINA B* se encuentra ligada a la división de células corticales durante la

organogénesis del nódulo, resulta entonces posible explicar la formación más precoz de nódulos por esta cepa, en comparación con la cepa 55N1.

También se analizó la acumulación de transcritos de *CDC2* (Figura 1.15). En los dos tiempos evaluados en Alubia, el nivel fue superior con la cepa simpátrica 55N1 tanto a las 12 como a las 24 hpi. En la variedad Nag12, ya a las 12 hpi mostró niveles significativamente superiores en raíces infectadas con las cepas SC15, mientras que con la cepa 55N1 fue superior a las 24 hpi.

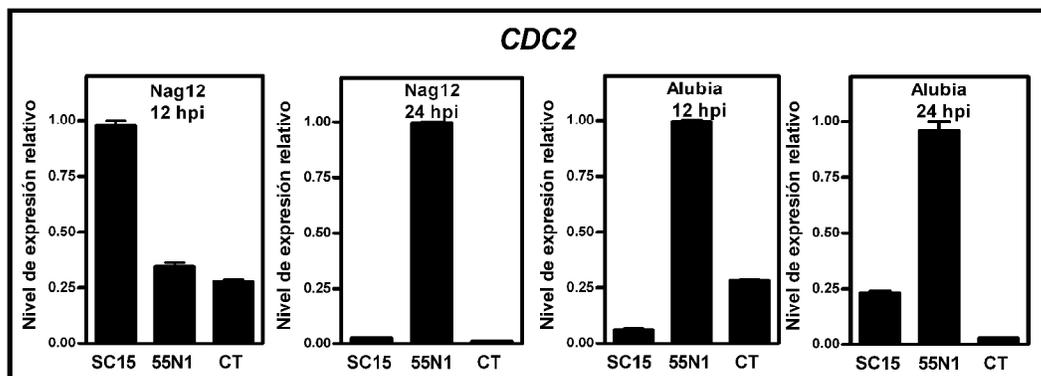


Figura 1.15. *qRT-PCR* de *CDC2* en raíces de poroto Nag12 y Alubia. A las 12 y 24 hs post-inoculación se cosecharon las raíces inoculadas con cultivos de SC15 ó 55N1, como cepas representativas de los linajes *nodC-α* y δ . El tratamiento control consistió en raíces inoculadas con medio de cultivo YEM. Los desvíos estándar corresponden a dos réplicas técnicas de una muestra biológica. Los datos se normalizaron por *EF-1α*.

Estos resultados sugieren que la preferencia por las cepas más competitivas se manifiesta en estadios tempranos, ya que a las 24 hpi se observaron diferencias significativas en el nivel de mensajeros de las nodulinas examinadas, así como genes de activación del ciclo celular, que promueven la activación de las primeras divisiones corticales, responsables de la formación de los primordios en las raíces.

Discusión de resultados y conclusiones

La preferencia mutua entre porotos y rizobios de un mismo centro de diversificación no restringe la nodulación cruzada entre variedades de poroto de Mesoamérica y rizobios de los Andes del Sur y viceversa, sino que se manifiesta como una mayor ocupación de nódulos en la simbiosis de poroto con cepas de *R. etli* simpátricas (Aguilar *et al.*, 2004). Estos resultados abrieron nuevas direcciones para encarar la profundización y caracterización de este rasgo que presenta la asociación entre poroto y rizobios. El análisis de distintos parámetros fisiológicos y moleculares que conducen a la formación del nódulo en las distintas combinaciones de los pares simbióticos nos indicaron que el hospedador responde diferente a la infección con los linajes de *R. etli nodC- α* y *- δ* .

En los ensayos descritos en la primera parte de este capítulo se ha demostrado que cepas de *R. etli* con los alelos *nodC* tipo- α y $-\delta$ son más eficientes en la nodulación de *P. vulgaris* Nag12 y Alubia respectivamente. Este resultado define un nuevo rasgo en la asociación, aparte de la competencia por la nodulación, ya descrita en trabajos previos (Aguilar *et al.*, 2004). Esto se apoya en los análisis de evaluación de la efectividad o capacidad simbiótica de las cepas, ponderada según los criterios de precocidad y número de nódulos desarrollados en función del tiempo desde la infección, ya que se pudo apreciar que las cepas que provienen del mismo centro geográfico que el hospedante son más eficientes en la nodulación del mismo.

Estas diferencias se identificaron en ensayos realizados en condiciones controladas y reproducibles tanto para la preparación de los inóculos bacterianos como las de crecimiento de las plantas, lo cual nos permite concluir que las diferencias observadas en la cinética de nodulación por las distintas cepas de *R. etli* resultan de la interacción entre ambos simbioses y no de variables ambientales. La formación precoz de los nódulos por las cepas más competitivas y eficientes es importante ya que restringe ulteriores infecciones por otras cepas, que no resultan tan beneficiosas como las cepas simétricas.

El contacto de la planta con el rizobio compatible inicia una serie de respuestas mutuas, algunas de las cuales presentan cierta especificidad. Así, antes de infectar las raíces, los rizobios colonizan la rizósfera (Dazzo *et al.*, 1976,1984). La adsorción de las bacterias a las raíces es débil, reversible e inespecífica y estarían involucradas las ricadesinas, proteínas de unión a Ca^{2+} , y polisacáridos de la pared bacteriana. Además, las raíces poseen proteínas denominadas lectinas, que son abundantes en el extremo de crecimiento polar de los pelos radicales, por lo que juegan un rol importante en la adsorción de los rizobios en las primeras etapas de la interacción (Dazzo, 1984; Kijne, 1992). Tras la síntesis de microfibrillas de

celulosa, la fijación de los rizobios a los pelos se torna irreversible. Esta unión del rizobio constituye el primer paso en la que se manifestaría la especificidad por el simbiote (Dazzo *et al.*, 1976; Dazzo *et al.*, 1984; Caetano-Anolles y Favelukes, 1986). Si bien la caracterización de todos los mecanismos por los cuales las bacterias difieren en su capacidad competitiva es limitada, es posible que la capacidad de “*attachment*” y colonización de las raíces de las plantas constituyan pasos importantes para iniciar eficientemente la simbiosis.

Las respuestas morfológicas de la raíz que son detectables microscópicamente y han sido señaladas como respuestas específicas de la interacción simbiótica comprenden el atrapamiento de la colonia bacteriana, el enrollado del pelo radical y la formación de los hilos de infección. Estudios previos en diferentes leguminosas han descrito la formación del IT entre las 24 y 72 hpi (Schäuser *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2002; Tansengco *et al.*, 2003; Kuppusamy *et al.*, 2004; Veereshlingam *et al.*, 2004; Ooki *et al.*, 2005; Lombardo *et al.*, 2006; Sandal *et al.*, 2006; Starker *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2006; Middleton *et al.*, 2007). En los ensayos llevados a cabo con poroto se pudieron detectar en Nag12 los primeros IT a las 24 hpi y más tardíamente en Alubia, a los 4 dpi. Los resultados de competencia en la formación de IT en Nag12 indican que los primeros IT se formaron con la cepa *nodC-α*, y a los 4 dpi, si bien ya se observaron IT por las dos cepas *nodC-δ*, estos fueron significativamente menos numerosos. De forma análoga, en la variedad Andina, predominaron las dos cepas *nodC-δ* en los IT formados. Estos resultados sugieren entonces que tanto la precocidad en la formación como el número de IT están correlacionados con la preferencia de la asociación. La capacidad de las cepas de ambos linajes de infectar precozmente y en mayor número las raíces determinaría el porcentaje de ocupación de los nódulos.

Curiosamente, la proporción de IT formados por la cepa *nodC-α* versus las cepas *nodC-δ* en la variedad mesoamericana resultó inferior al porcentaje de ocupación observado en nódulos maduros, de un 60-80% ITs en comparación con el 95% de ocupación de nódulos. Este dato sugiere que la planta, aún después de infectada, continúa seleccionando a la más eficiente más allá de la etapa de formación del IT.

El análisis de la eficiencia de las asociaciones variedad de poroto x linaje de rizobio constituyó otro ángulo alternativo para examinar la ocurrencia de afinidad entre porotos y rizobios. El desarrollo foliar es un parámetro relacionado positivamente con el número de vainas y el rendimiento del cultivo (Pandey & Gritton, 1975). Como la planta contribuye con los compuestos carbonados para proveer de energía a la actividad fijadora de nitrógeno y esqueletos carbonados para asimilar el amonio, existe una relación directa entre fotosíntesis y fijación biológica. Ambos procesos están afectados recíprocamente: una mayor tasa de

fijación de nitrógeno como resultado de una mayor actividad fotosintética (mayor biomasa aérea llevando a cabo el proceso de fotosíntesis), y un aumento en la FBN por el aporte de hidratos de carbono de la planta al nódulo. Es un proceso de control del tipo homeostático, en el cual la planta equilibra la demanda de nitrógeno fijado con su capacidad de aportar fotosintatos a los nódulos para lograr un funcionamiento armónico.

Existen numerosos métodos para cuantificar la fijación de N en cultivos de poroto, y todos tienen sus ventajas y desventajas (Grageda-Cabrera *et al.*, 2003). Las técnicas isotópicas son consideradas como las más confiables ya que suministran valores cuantitativos e integrados del N fijado, que permiten distinguir entre el N fijado biológicamente y el que contribuye el suelo (Faust, 1986; Danso *et al.*, 1993). La complejidad del ensayo y la necesidad de equipos especializados para su detección hacen que este criterio de determinación haya sido usado en pocos casos. Otros métodos que permiten cuantificar de forma indirecta el nitrógeno fijado biológicamente son el de actividad de reducción de acetileno (ARA) y contenido de ureidos (Dart, 1972; Patterson, 1982). La determinación de los valores acumulados de materia seca en la parte aérea de la planta fue el criterio que empleamos para la evaluación de la eficiencia de la FBN. En general, observamos que la acumulación de materia seca fue inferior en las plantas inoculadas respecto de las que recibieron nitrato como fuente de nitrógeno. Los requerimientos energéticos de la planta para soportar la actividad fijadora de nitrógeno o asimilación de nitrato son importantes, aunque comparadas entre ellas, la asimilación de NO_3 por parte de la planta representa un costo energético menor que la FBN (la planta debe destinar entre 6 y 12 g de compuestos carbonados por cada gramo de N fijado, mientras que la asimilación de nitratos del suelo es entre 6 a 8 veces más económico para la planta en términos energéticos), y por ello es esperable que la acumulación de materia seca en la parte aérea de plantas inoculadas no supere a las tratadas con nitrato.

En promedio, las plantas inoculadas con cepas con el alelo *nodC- α* fueron más eficientes que las plantas inoculadas con las cepas con el alelo *nodC- δ* en Nag12, y a la vez, ambas superaron al control sin inocular, aunque no llegaron a resultar tan efectivas como el tratamiento con KNO_3 . Por otro lado, Alubia, más eficientemente nodulada por las cepas *nodC- δ* , no presentó variación en la materia seca acumulada respecto de las plantas inoculadas con las cepas *nodC- α* . Sin embargo, éstas últimas no fueron muy eficientes, ya que no se diferenciaron significativamente del control sin inocular. Estos resultados indican que hay un efecto positivo en la inoculación de las plantas de la variedad Nag12, particularmente, con rizobios que provienen del mismo centro geográfico. Estos resultados ameritan analizar el beneficio del uso de biofertilizantes explotando la afinidad de la combinación cultivar de

poroto y genotipo de rizobio. Por otro lado, el uso de biofertilizantes representa una biotecnología amigable con el medio ambiente y más económica, considerando que el uso de nitrógeno sintético en los últimos 40 años ha aumentado de 3.5 millones a 80 millones de toneladas, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, incrementándose sus costos de producción a más de U\$\$ 20 billones anualmente.

Dado que observamos una respuesta variable de la planta frente a los dos linajes de rizobios analizados, decidimos examinar si la planta también presenta diferencias en el tamaño de los nódulos formados por rizobios que difieren en su capacidad competitiva y grado de efectividad, tal como se expuso anteriormente. En la asociación simbiótica la relación resulta beneficiosa para ambos organismos, o en su defecto puede derivar en una interacción de tipo parasitaria. Existen casos en la naturaleza en los que predominan bacterias altamente infectivas, pero muy poco efectivas para la FBN (Denison, 2000). En estas asociaciones es común observar que el hospedador aplica una sanción a estas bacterias alojadas en los nódulos, básicamente, restringiendo el flujo de carbohidratos hacia los mismos. Si bien los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que posee la planta para aplicar sanciones a bacterias inefectivas son variados, todas ellas determinan un fenotipo compartido que consiste en la formación de nódulos pequeños. La comúnmente denominada “*host sanctioning*” (sanción del hospedante) hace referencia a la provisión diferencial de recursos hacia nódulos que están fijando más nitrógeno (y que tienen menor probabilidad de senescer) y su limitación hacia los nódulos ocupados por bacterias ineficientes (“*cheaters*”), que actúan como sumideros (Denison, 2000). Otros ejemplos de sanción son la inducción de respuestas localizadas, como por ejemplo, la respuesta hipersensible (Agrios, 1997), la restricción de difusión de O₂ a los nódulos, limitando de esta forma la respiración (Denison, 1998).

En Nag12 y Alubia se formaron nódulos de mayor diámetro en simbiosis con sus respectivas cepas simpátricas, SC15 y 55N1, respectivamente. Teniendo en cuenta que un mayor tamaño reflejaría una mayor masa de tejido nodular activo en la FBN, este dato indicaría el establecimiento de una simbiosis más efectiva en los respectivos casos de interacción.

Estos resultados indican la ocurrencia de sinergismo durante el ciclo del cultivo del poroto, mediante el cual, el rizobio más competitivo no sólo ocupa una mayor proporción de los nódulos, sino que al desarrollar una mayor masa nodular llevaría a cabo una mayor FBN, lo cual podría generar factores de selección por parte del hospedador. Además, en la senescencia finalmente los rizobios son devueltos al suelo aumentando su representatividad en la rizósfera. Cabe aclarar que los bacteroides de los nódulos formados en plantas como poroto,

del tipo determinados, retienen su capacidad de multiplicación en vida libre una vez despedidos del nódulo tras la senescencia del mismo.

El análisis transcripcional de una serie de nodulinas indica que el programa genético de nodulación se activa más tempranamente en raíces infectadas por cepas que han coevolucionado con el hospedador. Por esta razón, la expresión de esos genes podría considerarse como indicador de la afinidad del poroto por ciertas cepas de rizobio y, en última instancia, del grado de competencia por la nodulación.

La afinidad se manifestaría a tiempos muy tempranos, 24 hpi, en el cual las diferencias en la acumulación de transcritos de *ENOD40* y *ERN* son los más significativos en las combinaciones más eficientes. Dado que estos genes se expresan como parte de una vía de traducción de señales disparada desde la percepción del factor de nodulación por el receptor, podemos inferir que la afinidad implica un reconocimiento eficiente y precoz de las señales moleculares generadas por los rizobios simpátricos. Asimismo, el análisis de los niveles de expresión de una serie de genes que participan en el control del ciclo celular, como *CDC2* y *CICLINA B*, reflejarían la entrada en mitosis de las células del córtex externo, evento que de acuerdo a los niveles de expresión cuantificados en las interacciones más eficientes, transcurriría prematuramente.

A partir de los resultados mostrados en este capítulo podemos concluir que la afinidad entre genotipos de poroto pertenecientes a los centros de diversificación y los respectivos linajes de *R. etli* se manifiesta en un conjunto de respuestas fisiológicas, morfológicas y moleculares, todas las cuales forman parte de la interacción simbiótica. Algunos de los resultados, tales como la precocidad de formación de nódulos y la capacidad de acumular más materia seca en la parte aérea, tienen importancia práctica teniendo en cuenta el desafío que enfrenta el cultivo de poroto para aumentar su productividad en regiones en las cuales constituye un alimento importante.

Capítulo 2

Caracterización química del factor de nodulación sintetizado por cepas de R. etli representativas de los centros de diversificación del poroto

Como fuera descrito en la sección introductoria, el factor de nodulación ó LCO, producido por los rizobios es una molécula señal que provoca en la planta la activación del programa de diferenciación radical que conduce a la formación del nódulo. La estructura química de esta molécula se caracteriza por poseer un esqueleto básico de N-acetilglucosamina y diversos grupos funcionales como sustituyentes tanto en el extremo reductor como en el no reductor. Los diversos rizobios producen LCOs que se diferencian entre sí y que confieren especificidad a la asociación con determinadas leguminosas. En este capítulo examinamos la estructura del factor de nodulación en un grupo de cepas de *R. etli* pertenecientes a los linajes *nodC- α* y *nodC- δ* que representan a los centros de diversificación del poroto.

☑ **Estructura de los LCOs producidos por cepas de *R. etli* representativas de las variantes alélicas $-\alpha$ y $-\delta$ del gen *nodC***

✓ **Análisis por cromatografía en capa delgada**

La producción de LCOs *in vitro* fue inducida incubando a los rizobios en medio suplementado con flavonoides y el precursor radioactivo N-acetilglucosamina. El extracto butanólico de los cultivos rizobianos fue analizado por cromatografía en capa delgada (TLC, *Thin Layer Chromatography*), y revelado por autorradiografía. Como control del efecto inductor de los flavonoides, se incluyeron cultivos de rizobios en medio sin inductor. Este procedimiento nos permitió confirmar la efectiva producción de LCOs y eventualmente comparar las características migratorias de los mismos, las cuales dependen principalmente de la hidrofobicidad de las moléculas. Así, se espera que las bandas de mayor movilidad se correspondan con compuestos de carácter hidrofóbico mientras que las bandas de menor movilidad con compuestos de naturaleza hidrofílica, revelándose en la zona media de la placa. En el panel A de la **Figura 2.1** se puede observar que las cepas SC15 y 55N1 producen LCOs en respuesta a la presencia de los inductores naringenina y genisteína. Además, los perfiles de bandas son comparables aunque la intensidad de las bandas indica una mayor producción por la cepa SC15. En el ensayo que se muestra en el panel B de la figura se estudiaron otras cepas *nodC- α* y *nodC- δ* , y además se ensayó apigenina como inductor. Se encontró que los tres

flavonoides empleados inducen la producción de FN aunque difieren en la capacidad inductora, resultando la apigenina el flavonoide menos eficiente y la genisteína el más eficiente. El perfil electroforético fue comparable en todos los casos: se observó una banda predominante de movilidad semejante en todas las cepas. En este ensayo, a diferencia del mostrado en el panel A, la cepa 55N1 y también la 191N2 resultaron en una muy baja producción de LCOs. Las muestras examinadas en las TLC de los paneles A y B de la Figura 2.1 corresponden a diferentes cultivos de la cepa 55N1. En el panel A se detectó la producción de LCOs por esta cepa, pero en la cromatografía del panel B, la intensidad de la señal en la autorradiografía fue muy débil, en general para casi todas las cepas. Este resultado es atribuible a una muy baja incorporación del precursor radiactivo, ya que esta cepa posee efectivamente la capacidad de sintetizar LCOs en presencia de flavonoides, o menor tiempo de exposición de la autorradiografía. También es posible que los flavonoides usados no fueron los óptimos para lograr la activación de la síntesis de los LCOs vía inducción del activador transcripcional NodD.

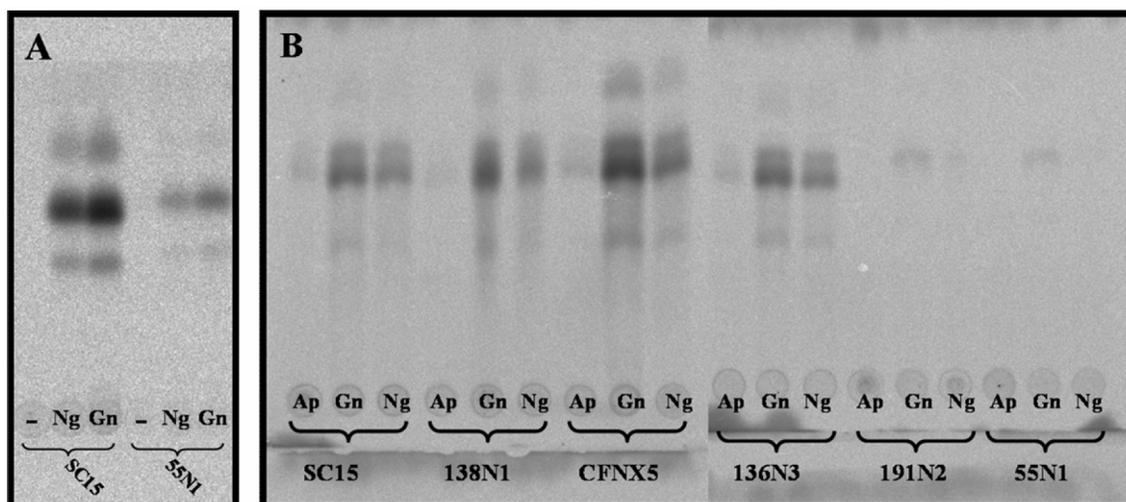


Figura 2.1. LCOs sintetizados y excretados por cepas *nodC- α* y *nodC- δ* . Separación por TLC de fase reversa de extractos butanólicos del sobrenadante de cultivos inducidos con flavonoides comerciales: apigenina (Ap), genisteína (Gn) y naringenina (Ng) a una concentración final 1 μ M fueron analizados. Los LCOs se marcaron radiactivamente en los cultivos inducidos por incorporación de 14 C-N-acetil-D-glucosamina en el esqueleto del LCO. (A) Producción de LCOs por las cepas SC15 y 55N1, con Ng y Gn. (B) Producción de LCOs por las cepas de *R. etli* SC15, 138N1, 136N3 y CFNX5 (*nodC- α*) y 191N2 y 55N1 (*nodC- δ*) en cultivos inducidos con Ap, Gn y Ng.

En otro ensayo similar se examinaron los LCOs producidos por un conjunto mayor de cepas de *R. etli*, pertenecientes a los linajes *nodC- α* y *nodC- δ* , usando genisteína como inductor de síntesis. En la **Figura 2.2**, que muestra la correspondiente cromatografía, se puede apreciar

que las distintas cepas compartan el mismo patrón de bandas consistente en una banda intensa y otra de menor movilidad en la placa e intensidad relativamente débil.

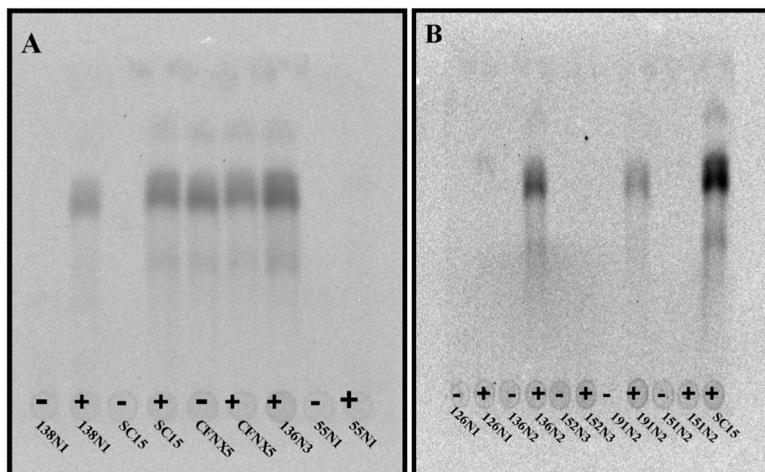


Figura 2.2. LCOs sintetizados y excretados por cepas *nodC-α* y *nodC-δ* inducidas y no inducidas. Extractos butanólicos de sobrenadante de cultivo sin el agregado del inductor (-); o bien agregando el flavonoide genisteína a una concentración final 1μM fueron separados por TLC de fase reversa, y revelados por autorradiografía. Se procesaron cultivos de 1 ml en medio de cultivo B-, en presencia de ¹⁴C-N-acetil-D-glucosamina para incorporar marca radioactiva en el esqueleto del LCO. (A) Se analizaron las muestras provenientes de las cepas *nodC-α* 138N1, SC15, CFNX5 y 136N3 (para esta última no hay control s/inductor), y de la cepa *nodC-δ* 55N1. (B) A excepción de la última calle, en la que se sembró el extracto butanólico de los LCOs de la cepa SC15, el resto de los carriles corresponde a las cepa *nodC-δ* 126N1, 136N2, 152N3, 191N2 y 151N2. (+): Con inductor, (-): Sin inductor.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las cepas de *R. etli* pertenecientes a los genotipos *nodC-α* y *nodC-δ* –algunas nativas del Noroeste Argentino- producen LCOs con una estructura aparentemente similar entre ellas, y que dicha producción depende de la presencia de inductores del tipo flavonoides, siendo la genisteína y naringenina los más eficientes. Además, se concluye que los patrones de bandas observados en las distintas cepas *nodC-α* y *nodC-δ* fueron similares entre sí.

Finalmente, la intensidad de bandas sugiere que las cepas del linaje *nodC-α* producen *in vitro* una mayor cantidad de NF, sin embargo las características semicuantitativas del método analítico aplicado no permiten especular sobre el significado de esa diferencia y menos aun si la misma refleja la situación *in situ* durante la interacción con la raíz de poroto.

Desde el punto de vista práctico, estos ensayos en TLC fueron importantes como una etapa necesaria de evaluación de producción de LCOs en respuesta a flavonoides inductores, previa al análisis estructural de las moléculas.

✓ Determinación de la estructura de los LCOs mediante HPLC-MSMS

La estructura química de los LCOs producidos por las cepas *nodC-α* y *-δ* fue determinada por espectrometría de masas. El método de HPLC combinado con MSMS genera un patrón de señales consistente en iones que poseen asociado una relación masa/carga que permite su identificación y que ayuda a caracterizar la molécula. De esta manera la interpretación del espectro permite proponer la estructura del esqueleto principal de la molécula y la naturaleza de los sustituyentes.

En un primer estudio determinamos la estructura correspondiente a los LCOs de las cepas SC15 y 55N1, *nodC-α* y *nodC-δ*, respectivamente, teniendo en cuenta que fueron usadas en varios ensayos de competencia por la nodulación, expresión de genes de poroto en respuesta a la inoculación y ensayos descritos en el Capítulo 1 de este trabajo.

Se prepararon muestras de LCOs a partir de cultivos de las cepas SC15 y 55N1 inducidos con el flavonoides naringenina. El extracto butanólico del medio de cultivo se purificó (ver Materiales y Métodos), y finalmente, se determinó la estructura de los LCOs presentes en las muestras por HPLC-MSMS. La única diferencia encontrada, comparando los LCOs sintetizados por la cepa *nodC-α* SC15 y la cepa *nodC-δ* 55N1, fue la presencia de un grupo acetilo en la fucosa del extremo reductor que a diferencia de SC15 no fue detectado en 55N1. Esta diferencia nos indujo a extender el análisis a otros aislamientos de *R. etli* usados de rutina en nuestro laboratorio, para evaluar si la falta de acetilación de la fucosa es un rasgo común en las cepas *nodC-δ*.

Se ensayaron otras tres cepas pertenecientes al linaje *nodC-α* (cepas 136N3, 138N1 y CFNX5) y otras cuatro cepas pertenecientes al linaje *nodC-δ* (cepas 136N2, 151N1, 1373 y 191N2). No se obtuvieron datos en los casos de las cepas 151N1, 1373, 136N3 y 138N1, probablemente debido a la baja cantidad de LCOs en la muestra analizada por debajo del nivel de detección del equipo. La interpretación del espectro de masas resultante del análisis de las 5 cepas se resume en la **Tabla 2.1**. Nuestro análisis no comprendió a la cepa de referencia de la especie *R. etli* (cepa CFN42) dado que la estructura de los LCOs sintetizados por CFN42 ha sido ya descrita por Cárdenas *et al.*, (1995) y Pacios-Bras *et al.*, (2002), sin embargo agregamos en la **Tabla 2.1** los datos de dicha estructura en la comparación con los resultados del análisis de nuestras cepas.

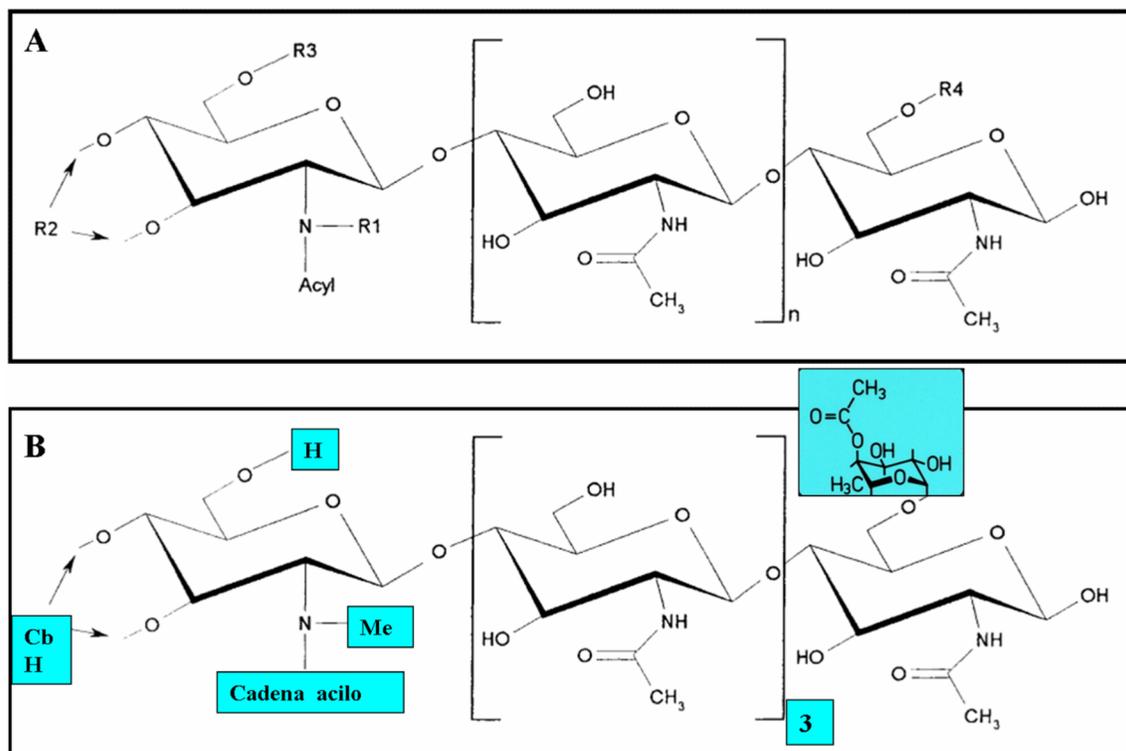


Figura 2.3. Estructura de la molécula de LCO sintetizada por *R. etli*. (A) Se muestra el esqueleto oligosacarídico básico de residuos de N-acetil glucosamina con las posiciones de sustituciones indicadas como R1 a R4 y que se detallan en la tabla 2.1. (B) Esquema de la estructura consenso sintetizada por las cepas SC15, 136N2, 191N2, CFNX5 y CFN42.

Cepa de <i>R. etli</i>	Sustituciones					
	n	Cadena acilo	R1	R2	R3	R4
Cepas <i>nodC-α</i>						
CFN42	3	C18:0, C18:1 C17:1	Me Me	H,Cb H	H H	Fuc, AcFuc
SC15	2,3	C16:0, C16:1	Me	H, Cb	H	Fuc, AcFuc, MeFuc
	3	C16:0, C16:1	Me	H, Cb	H	Fuc, AcFuc, MeFuc
CFNX5	3	C18:1	Me	Cb	H	AcFuc
Cepas <i>nodC-δ</i>						
55N1	3	C18:1	Me	H, Cb	H	Fuc, MeFuc
	3	C16:0, C16:1	Me	H, Cb	H	Fuc, MeFuc
191N2	3	C18:1	Me	H	H	AcFuc
	3	C16:0, C16:1	Me	H	H	AcFuc, MeAcFuc
136N2	3	C18:1	Me	H,Cb	H	AcFuc, MeAcFuc

Tabla 2.1. Resultado del análisis de estructura química de los LCOs producidos por cinco cepas de *R. etli* con los alelos *nodC-α* y *nodC-δ*. Se analizó la estructura de los LCOs sintetizados y excretados en medio de cultivo B suplementado con naringenina por HPLC-MSMS. El extracto butanólico se procesó hasta la purificación de la fracción enriquecida en LCOs. Esta muestra se separó por HPLC y las distintas fracciones fueron analizadas por MSMS. Las sustituciones R1-R4 hacen referencia a las sustituciones del esqueleto básico compuesto por 5 residuos de N-acetil glucosamina. El esquema de la molécula se muestra en la Figura 2.3, A. Se incluyó la estructura de la cepa de referencia CFN42 (Cárdenas *et al.*, 1995). Abreviaturas: (n): número de residuos de N-acetil glucosamina comprendidos entre los residuos de los extremos reductor y no reductor de la molécula. (C16 ó 18): longitud de la cadena acilo, que puede tener una insaturación. (Me): metilo. (H): hidrógeno. (Cb): carboamiloil. (Fuc): fucosa. (Ac): acetilo.

Los LCOs sintetizados por las cepas examinadas poseen en el extremo no reductor un residuo acilo de 18 átomos de C correspondiente al denominado ácido vaccénico (ácido *cis*-delta-11-octadecénico, C_{18:1}). También se ha detectado en algunos casos la presencia de ácido palmítico o su derivado insaturado ácido palmitoleico (ácido delta-9-*cis*-hexadecénico, C_{16:1}). Además, todos comparten la sustitución de un residuo metilo en la posición R1 del extremo no reductor. En la posición R2, todos los factores poseen carbamoil (Cb) como sustitución, excepto la cepa 191N2. En la posición R3 fue consistente la presencia de H en los LCOs sintetizados por todas las cepas. En la posición R4 del extremo reductor se identificó la presencia de un residuo de fucosa que a su vez tiene en la posición 3' un residuo acetilo en todas las cepas examinadas, tanto *nodC-α* como *nodC-δ*, excepto para la cepa *nodC-δ* 55N1. La señal correspondiente a esta sustitución no fue detectada en el espectro del extracto proveniente de la cepa 55N1 en ninguna de las dos determinaciones analíticas preparadas a partir de cultivos inducidos de esta cepa.

La presencia del residuo fucosil acetilado en todos los casos así como la ausencia del mismo en el caso de los LCOs sintetizados por la cepa 55N1 fue confirmado realizando un análisis adicional consistente en un tratamiento de hidrólisis suave con NH₄OH, el cual es conocido por provocar la remoción de acetilos de la molécula. El resultado del análisis mediante HPLC-MSMS de la cepa 55N1 luego del tratamiento con NH₄OH confirmó la ausencia de este sustituyente únicamente en los LCOs sintetizados por 55N1. Este resultado indica que desde el punto de vista de la acetilación del extremo reductor de los LCOs, la cepa 55N1 es la excepción y no la generalidad que caracteriza a las cepas *nodC-δ*.

Estos datos, junto a la reconocida capacidad de poroto de ser nodulado por un grupo heterogéneo de rizobios, sugieren un reconocimiento por el receptor del NF de diversas estructuras principalmente a nivel de los sustituyentes en el extremo reductor.

La **Tabla 2.1** muestra a los LCOs detectados en la condición de cultivo con inductor. Del análisis de la misma surge que la principal diferencia observada en el espectro de LCOs sintetizados está en la posición R4. En el caso de las cepas *nodC-α* SC15 y CFNX5, ésta posición se encontró acetilada o sin ninguna decoración. En las cepas *nodC-δ* 136N2 y 191N2 se encontraron los sustituyentes AcFuc, MeFuc, y MeAcFuc, siendo esta última sustitución exclusiva de estas dos cepas, ya que la doble sustitución en la fucosa (MeAcFuc) no se detectó en ninguna de las dos cepas *nodC-α* analizada. El espectro de LCOs sintetizados por las cepas 136N2 y 191N2 fue similar, ya que sólo se diferenciaron en el ácido graso de 16 carbonos con un grupo Cb, que se encuentra ausente en la cepa 191N2.

La cepa 55N1 constituye la excepción, en cuanto a que ninguna de las formas de LCOs sintetizadas presentó el grupo acetilo en la fucosa. Sólo detectamos el grupo metilo como sustituyente en el residuo fucosil.

Los datos resultantes del análisis de los NF producidos por cepas del linaje *nodC-α* y *nodC-δ* de *R. etli* no revelan diferencias significativas y consistentes en cepas con el mismo alelo del gen *nodC*. Los resultados obtenidos con las cepas de *R. etli* examinadas fueron puestos en el contexto de la estructura de una diversidad de rizobios también capaces de nodular poroto (D'Haese & Holsters, 2002). De ese trabajo surge que las variantes aparecen en el extremo reductor, mientras que son conservados los sustituyentes en el extremo no reductor. Por ejemplo, la especie *R. tropici* presenta un residuo sulfato en el extremo reductor, que también lo presenta la cepa T44N22, ambas capaces de nodular eficientemente poroto (Aguilar *et al.*, 2006).

☑ Estudio del gen *noI* en cepas de *R. etli*

El resultado descrito en la sección precedente, mostrando que únicamente los LCOs producidos por la cepa 55N1 carecen del residuo acetilo en la fucosa del extremo nos condujo a investigar la presencia del gen *noI* en el genoma de 55N1 y en otras cepas de *R. etli*.

La acetilación del residuo fucosil del NF está determinada por una acetil transferasa codificada por el gen *noI*. Se analizó una colección de 22 cepas de *R. etli* con las formas *nodC-α* (n: 4) y *-δ* (n: 18) usando la reacción de PCR y un par de cebadores específicos deducidos de la secuencia del gen *noI* de la cepa de referencia *R. etli* CFN42. El tamaño del fragmento de amplificación esperado es de 330 bp.

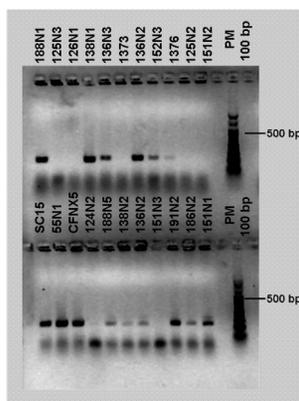


Figura 2.4. Amplificación por PCR del gen *noI* en cepas de *R. etli*. Gel de agarosa en el que se examinó la amplificación del gen *noI* usando *primers* específicos diseñados a partir de la secuencia publicada. Las cepas *nodC-α* fueron 136N3 y 138N1 (en calles superiores) y SC15 y CFNX5 (en calles inferiores). El resto de las muestras corresponde a cepas *nodC-δ*.

El resultado del análisis por PCR de *noI* se muestra en la **Figura 2.4**. Las 4 cepas *nodC-α* (SC15, CFNX5, 136N3 y 138N1) resultaron positivas, mientras que sólo 11 de las 18 cepas

nodC-δ analizadas resultaron positivas. En particular, amplificaron las muestras de las cepas 55N1, 136N2 y 191N2, cuyos LCOs fueron determinados en este trabajo demostrando que la cepa 55N1 a diferencia de 136N2 y 191N2 no acetila la fucosa del extremo reductor. Las cepas que no amplificaron fueron sujetas a tres intentos de amplificación para corroborar el resultado.

Estos resultados demostraron en primer término que la presencia de la secuencia del gen *noI*L es ubicua en el genoma de cepas *nodC-α* y *nodC-δ*, y en segundo término, que la cepa 55N1 posee al menos una secuencia que es reconocida por los primers específicos *noI*L generando un fragmento de idéntico tamaño al del resto de las cepas. Sin embargo, es importante destacar que la amplificación de la secuencia *noI*L no implica la existencia de un gen funcional. Entre las posibilidades que explicarían la falta de acetilación, no obstante poseer la secuencia *noI*L podemos mencionar: - podría tratarse de un pseudogen no funcional; - la cepa 55N1 poseería un alelo mutado del gen *noI*L, - las condiciones de inducción de síntesis *in vitro* de LCOs en la cepa 55N1 no serían las apropiadas para activar los determinantes de la acetilación de la fucosa.

Con el propósito de evaluar algunas de estas posibilidades, realizamos un estudio comparativo de la secuencia codificante del gen *noI*L de 55N1. A partir de los datos de secuencia disponible de la cepa CFN42, se diseñaron primers para amplificar por PCR el marco abierto de lectura del gen *noI*L de las cepas SC15, CFNX5 (*nodC-α*) y 55N1 y 191N2 (*nodC-δ*). Los fragmentos fueron clonados y secuenciados.

La traducción *in silico* de las secuencias de las cepas analizadas reveló un marco de lectura de 1179 bp, tal cual lo esperado según datos bibliográficos de la cepa CFN42, en todos los casos excepto en el de la cepa 55N1. El análisis de la secuencia del gen *noI*L de la cepa 55N1 de 2 clones independientes nos permitió identificar un codón de terminación de la traducción, por una transición de C a T, en la posición 325, además de otros cambios puntuales en la secuencia (**Figura 2.5**). Esta terminación prematura resultaría en la síntesis de un polipéptido truncado, que no sería funcional y que explicaría el defecto en la acetilación de los LCOs. Por otro lado, las secuencias de las cepas CFNX5 y 191N2 no presentaron cambios respecto a la cepa CFN42 (dato no mostrado).

Otra conclusión resulta del análisis del NF y del gen *noI*L de la cepa 55N1, que sugieren que la sola demostración de presencia del gen *noI*L (u otro *nod/nol*) no es suficiente para predecir la naturaleza del sustituyente presente en el NF.

CFN42	ATGATGAACGAGAGGTTGGAAATGCCGCTTTCAAAGGCTCCCGTAGGCATCGTGAGATG
55N1	ATGATGAACGAGAGGTTGGAAATGCCGCTTTCAAAGGCTCCCGTAGGCATCGTGAGATG
CFN42	TTGAGAATGCGAGCAAGAATTGTAGGTGGAAAGACAGTGCCTGAGGCGCCAGAGGCCGAC
55N1	GTGAGAATGCGAGCAAGAATTGTAGGTGGAAAGACAGTGCCTGAGGCGCCAGAGGCCGAC
CFN42	GATCGCGATCTAGCTTTAGACTTCGCCAAAGGAATACTCATTGTCTTGGTGATTTTCGGT
55N1	GATCGCGATCTAGCTTTAGACTTCGCCAAAGGAATACTCATTGTCTTGGTGATTTTCGGT
CFN42	CACCTGATACAATATATCTTTTACGAGGGTGATGGCTTCTGGGATTCGGCATGCTTCAAA
55N1	CACCTGATACAATATATCTTTTACGAGGGTGATGGCTTCTGGGATTCGGCATGCTTCAAA
CFN42	TCGATCTACATGTTTCACATGCCTCTCTTTATGGCGATAAGCGGATATCTCTCTAGATCA
55N1	TCGATCTACATGTTTCACATGCCTCTCTTTATGGCGATAAGCGGATATCTCTCTAGATCA
CFN42	GGGCTACTAGGCAAATCGTTCAGGCAAGCCATCGGTGATCGCGCGCTGCAGCTCCTGGTG
55N1	GGGCTACTAGGTAAATCGTTCAGGTAAGCCATCGGTGATCGCGCGCTGCAGCTCCTGGTG
CFN42	CCGACGCTGTTCTGGTGCACCCCTTTGGAGGCAGTCAAATTGCTCATGTTTCCCCGGCCG
55N1	CCGGCGCTGTTCTGGTGCACCCCTTTGGAGGCAGTCAAATTGCTCATGTTTCCCCGGCCG
CFN42	CCGGACGCACCTGGCAACCTTTTGCAATTCATGCACGATTCGTCGGCACATACTGGTTC
55N1	CCGGACGCACCTGGCAACCTTTTGCAATTCATGCACGATTCGTCGGCACATACTGGTTC
CFN42	ATCTGGGCTGCGTTTGTCTCTTTTCTTTTGGTCAAACCTATTTTCGATCTTCAACTCCGGG
55N1	ATCTGGGCTGCGTTTGTCTCTTTTCTTTTGGTAAACCTATTTTCGATCTTCAACTCCGGG
CFN42	TCGGCACGCTCTTTGCTTGTCTCATCCATACTGGTTCGAGTTGCCCGTGACGTTTTTCT
55N1	TCGGCACGCTCTTTGCTTGTCTCATCCATACTGGTTCGAGTTGCCCGTGACGTTTTTCT
CFN42	ATATTCCCTCTCATAAAGTACACCTATCCCTTTTCTGCATGGGATTTTCATTTGCGCAG
55N1	ATATTCCCTCTCATAAAGTACACCTATCCCTTTTCTGCATGGGATTTTCATTTGCGCAG
CFN42	TCGAGAGATTGGTGACGAGCATAATGCGGTATCATAAGCCACTCCTGATGATGTCCGCC
55N1	TCGAGAGATTGGTGACGAGCATAATGCGGTATCATAAGCCACGCCTGATGATGTCCGCC
CFN42	TCTATCGCGGCTAGCTTGTGCTTCATGGCGTGGCGCGAGGACACCTATCTCTACAACAAT
55N1	TCTATCGCGGCTAGCTTGTGCTTCATGGCGTGGCGCGAGGACACCTATCTCTACAACAAT
CFN42	CTCGCCTTAATCCAGGATCTGCAGTCGGCAAAAGATATCCTTCTGATGTTTTTTGGCTCG
55N1	CTCGCCTTAATCCAGGATCTGCAGTCGGCAAAAGATATCCTTCTGATGTTTTTTGGCTCG
CFN42	ACAGTGGCCTCTGCAGTGATGATCGAGATTCTGCTTCAATCCTGGAAAATTGGACGCTCG
55N1	ACAGTGGCCTCTGCAGTGATGATCGAGATTCTGCTTCAATCCTGGAAAATTGGACGCTCG
CFN42	AACCGGTTGGTTCGCTTTATCGCCGTGGAAGTGGGGCAGAGCACGCTCGTGTGTACCTG
55N1	AACCGGTTGGTTCGCTTTATCGCCGTGGAAGTGGGGCAGAGCACGCTCGTGTGTACCTG
CFN42	GTGCAGGCTACGGTATTCCGTCTCATGGATTTGATACAATACGGAGAACAATGGGCTCCC
55N1	GTGCAGGCTACGGTATTCCGTCTCATGGATTTGATACAATACGGAGAACAATGGGCTCCC
CFN42	ACAATGAGGTCTGGCGCGGCGGAATTCTCGGGACGATGATCATTGCCGTAGCACTAGCA
55N1	ACAATGAGGTCTGGCGCGGCGGAATTCTCGGGACGATGATCATTGCCGTAGCACTAGCA
CFN42	GTTTCGCTGGAGCGTGCAGGACATTCCCTATCTGTCCAGCTCATGCTTGGAAACGCCACCC
55N1	GTTTCGCTGGAGCGTGCAGGACATTCCCTATCTGTCCAGCTCATGCTTGGAAACGCCACCC
CFN42	CGCCTCGTTCGTTTCCGAGCAATCCTGCGAATAACTAG
55N1	CGCCTCGTTCGTTTCCGAGCAATCCTGCGAATAACTAG

Figura 2.5. Alineamiento de la secuencia de la región codificante del gen *noI*L de las cepas de *R. etli* 55N1 y CFN42. Se encontraron diferencias puntuales en la secuencia de la cepa 55N1, que están resaltadas en gris en la secuencia. El codón de STOP prematuro TAA está subrayado.

☑ **Investigación del efecto de la acetilación del fucosil en los LCOs sintetizados por *R. etli* sobre la competencia por la nodulación de *P. vulgaris***

Corvera *et al.*, (1999) han descrito a través de ensayos de simple inoculación que la deficiencia del grupo acetilo en el NF está asociado a una nodulación menos eficiente del cultivar cv. L3-111-CM de *P. vulgaris* pero no de Negro Jamapa ni de la especie *Vigna umbellata*. Además, se llevaron a cabo experimentos de cinética de nodulación que demostraron que la cepa silvestre CE3 resultó más eficiente en la formación de nódulos que el respectivo mutante *noIL*, CFNX289. Por otro lado, en la asociación *Lotus* sp.- *Mesorhizobium loti*, se encontró que los mutantes *noIL* presentan un fenotipo que es dependiente de la planta hospedadora ensayada, de tal manera que no afecta su asociación con *L. japonicus* pero sí con las especies *L. filicaulis* y *L. corniculatus* (Rodpothong *et al.*, 2009).

La ausencia de la acetilación de la fucosa en los LCOs de la cepa 55N1, sumado a su pobre capacidad competitiva de la cepa 55N1 observada en nuestros ensayos, motivó evaluar el significado de la acetilación en relación con la competencia por la nodulación.

Con este fin se evaluó la cepa CFNX289 (mutante en *noIL* obtenido por recombinación *in vitro*, cedido por David Romero, UNAM, México) y el aislamiento 55N1, el cual naturalmente no acetila. El ensayo también incluyó a las cepas 136N2, SC15, y CE3.

El experimento consistió en la coinoculación de poroto con mezclas en proporciones equivalentes de dos cepas y la evaluación cuantitativa de la ocupación de los nódulos mediante la identificación de la cepa ocupante. Las suspensiones formuladas se detallan en la **Tabla 2.2**. Como control se incluyeron plantas inoculadas individualmente con las cepas mencionadas. A los 30 días de inoculadas, se cosecharon los nódulos. Otro grupo de plantas sin inocular se empleó como control negativo.

Composición del inóculo	Criterio de identificación de las cepas	Composición del inóculo	Criterio de identificación de las cepas
SC15 + CE3	REP-PCR	CFNX289+55N1	Coloración y resistencia a Km
SC15 + 55N1	Coloración y RFLP- <i>nodC</i>	CE3+136N2	Coloración y RFLP- <i>nodC</i>
SC15 + 136N2	Coloración y RFLP- <i>nodC</i>	136N2+CFNX289	Coloración y resistencia a Km
SC15 + CFNX289	Resistencia a Km	CE3+CFNX289	Resistencia a Km

Tabla 2.2. Formulación de los inóculos en los ensayos de competencia por la nodulación de Nag12.

Para identificar los rizobios aislados del nódulo, que presentan el mismo perfil de restricción *nodC* (por ejemplo la mezcla de las cepas *nodC-α*) se utilizó como criterio de identificación la resistencia a kanamicina que expresa la cepa CFNX289. Por otro lado, para distinguir entre las cepas CE3 y SC15, ambas *nodC-α*, se realizó una PCR con los *primers* REP para generar “fingerprints” (Figura 2.6).

Un procedimiento alternativo que facilitó la distinción entre las cepas *nodC-α* y *nodC-δ*, fue a través del color adquirido por las colonias desarrolladas en medio YEM Rojo Congo, después de incubadas por 3 días a 4 °C. Las cepas *nodC-α* permanecieron blanquecinas y de aspecto más mucoso, mientras que las *nodC-δ* adquirieron un color fucsia, probablemente por mayor absorción del colorante del medio de cultivo, atribuible a diferencias en los niveles de celulosa de estos rizobios (Williams *et al*, 2008) (Figura 2.7). Los resultados obtenidos mediante este criterio de distinción fueron confirmados mediante RFLP del gen *nodC* en un grupo de aislamientos tomados al azar.

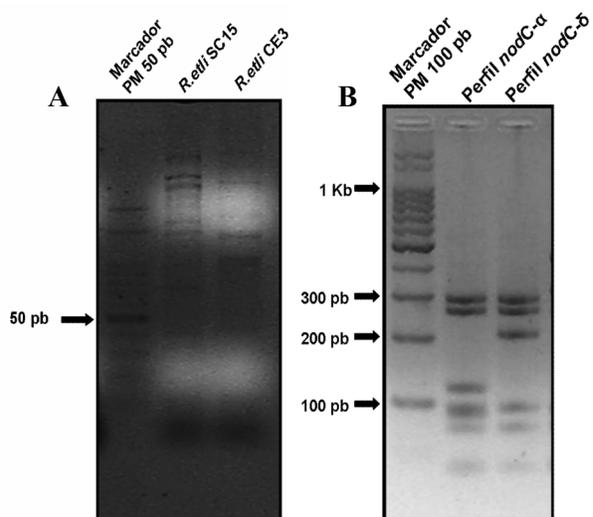


Figura 2.6. (A) AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) de las cepas SC15 y CE3. Esta técnica se empleó para distinguir la ocupación de los nódulos por dos cepas *nodC-α* que presentaban el mismo patrón de RFLP del gen *nodC* y apariencia en placa YEM Rojo Congo. (B) Perfil de restricción *HinfI* del fragmento del gen *nodC*. Se puede distinguir claramente la banda correspondiente al fragmento de 200 bp en el perfil delta.

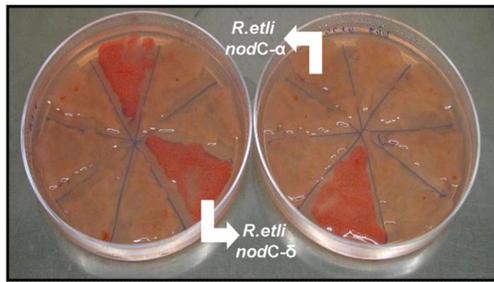


Figura 2.7. Diferencias fenotípicas entre cepas alfa y delta de *R. etli*. Rizobios aislados de nódulos 30 dpi con SC15-55N1 (izq.) y SC15-136N2 (der.). La suspensión de rizobios se sembró sobre YEM Rojo Congo. Los ensayos PCR-*nodC-HinfI* confirmaron que los aislamientos de color claro corresponden a *R. etli* SC15 y los oscuros corresponden a *R. etli* 55N1 (izq.) y *R. etli* 136N2 (der.).

La **Figura 2.8** muestra los resultados obtenidos en las coinoculaciones.

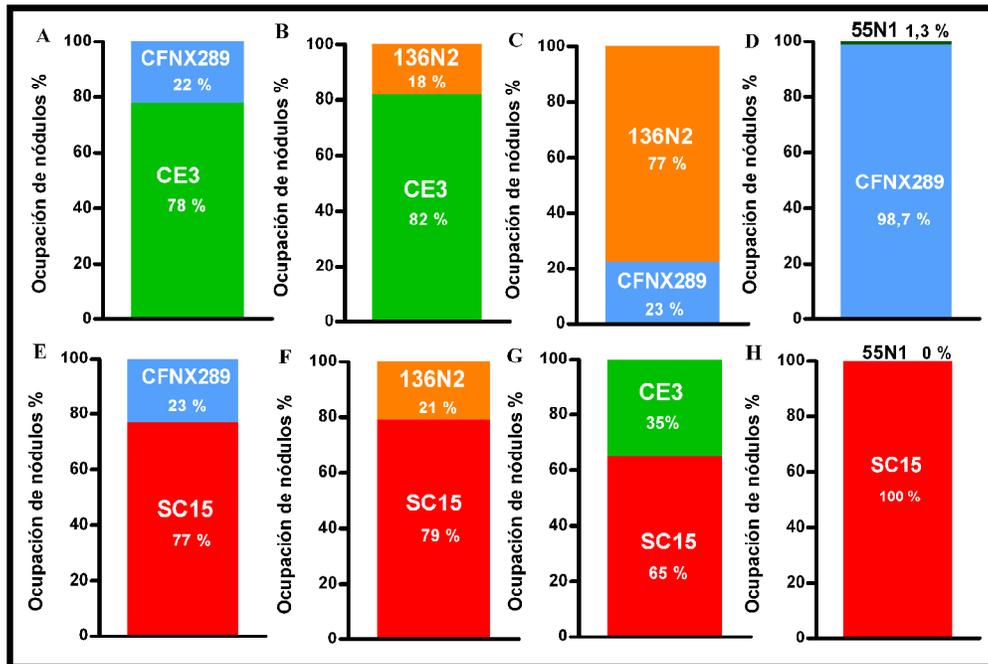


Figura 2.7. Porcentaje de ocupación de los nódulos en el ensayo de competencia en la var. Nag12. Se coinocularon plantas con las mezclas de las cepas indicadas en cada uno de los gráficos. Los nódulos se cosecharon y analizaron 30 días después de la inoculación. Están representados los valores como porcentaje de ocupación del total de nódulos analizados en cada caso. Los resultados son representativos de 6 muestras biológicas. El número de nódulos analizados para cada uno de los tratamientos fue de aproximadamente 150 (conformado por 6 plantas por tratamiento, aproximadamente 30 nódulos extraídos por planta).

La ocupación de los nódulos por la cepa *nodC-α* SC15 en plantas coinoculadas con las cepas *nodC-δ*, 136N2 ó 55N1, fue de un 79 y 100 %, respectivamente, que resultó de acuerdo a lo esperado, ya que las cepas alfa predominan en la ocupación de variedades mesoamericanas de poroto (**Figura 2.8, F y H**). De forma análoga, la cepa CE3 ocupó el 82 % de los nódulos frente a la cepa 136N2 (**Figura 2.8, B**).

Cuando se evaluó la competencia entre las cepas SC15 y CE3, la primera cepa ocupó el 65% de los nódulos, por lo que resulta aún muy competitiva frente a otra cepa con el mismo patrón polimórfico del gen *nodC* (**Figura 2.8, G**).

El mutante CFNX289 ocupó el 23 y 22 % de los nódulos en coinoculación con las cepas SC15 (**Figura 2.8, E**) y CE3 (**Figura 2.8, A**), respectivamente. Estos resultados indican que la acetilación es importante para la competencia no solo con su cepa isogénica sino también con otra cepa *nodC- α* , la cepa SC15.

En los resultados del trabajo que fue citado previamente (Corvera *et al.*, 1999) no se observaron diferencias significativas en el patrón temporal de formación de nódulos en el cultivar mesoamericano Negro Jamapa inoculado individualmente con las cepas CE3 y el mutante *noIL*. Sin embargo, en nuestros experimentos de coinoculación con estas dos cepas en un cultivar mesoamericano, encontramos que la cepa silvestre CE3 ocupó el 78% de los nódulos examinados.

Para evaluar el efecto de la mutación del gen *noIL* en la cepa del linaje *nodC- α* CFNX289 sobre la competencia con cepas *nodC- δ* , se realizaron dos ensayos. En uno, la coinoculación consistió en la mezcla de CFNX289 y 55N1, ensayo en el cual el mutante ocupó el 98,7% de los nódulos (**Figura 2.8, D**). En el otro ensayo, con la combinación entre CFNX289 + 136N2, la proporción de ocupación de los nódulos por la cepa CFNX289 fue 23% (**Figura 2.8, C**).

Estos resultados estarían indicando que la acetilación mediada por el gen *noIL* es importante para expresar la capacidad competitiva con cepas tanto del mismo linaje como con cepas *nodC- δ* que producen LCOs acetilados en su residuo fucosil. Sin embargo, en la competencia entre cepas de los linajes *nodC- α* y *nodC- δ* , que no producen LCOs acetilados, la cepa simpátrica se muestra más competitiva. Estos resultados permiten especular que además de la estructura del LCO existirían otros elementos de reconocimiento de la bacteria por parte de la planta que afectan la afinidad entre cepas y porotos mesoamericanos.

Análisis de la expresión de genes de *P. vulgaris* var. Nag12 en raíces inoculadas con una cepa de *R. etli* mutante en el gen *noIL*

En la sección precedente se mostraron resultados de ensayos de coinoculación que señalan la importancia de la acetilación del LCO producido por *R. etli* para su competitividad por la nodulación. En esta sección estudiamos la relación entre el patrón de expresión temprana de genes de poroto en respuesta a la infección y la presencia del grupo acetilo en la fucosa. Con

este propósito evaluamos los niveles de transcripto de genes que se activan en forma temprana en respuesta a la infección con rizobios.

Los genes analizados a las 24 hpi, todos provenientes de la biblioteca sustractiva, fueron los siguientes:

- a) Transducción de señales:
 - *Pv-RHS24-01*: codifica para un receptor tipo quinasa.
 - *Pv-RHS24-03*: codifica una RabA2, una GTPasa monomérica (Blanco *et al.*, 2009).
 - *Pv-RHS24-13*: codifica una proteína con dominio de unión a nucleótido y repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR).
 - *Pv-RHS24-02*, codifica para una proteína regulada negativamente en respuesta a la hormona auxina.

La cuantificación de los niveles de transcripto de estos genes se muestra en la **Figura 2.9**.

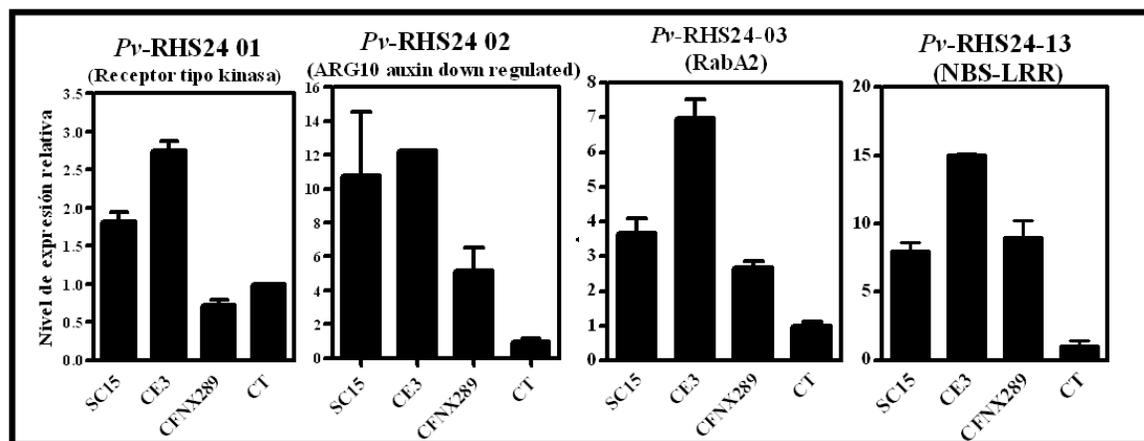


Figura 2.9. Análisis de expresión por *q*RT-PCR de genes de *P. vulgaris* en respuesta a la inoculación con las cepas SC15, CE3 y CFNX289. Se inoculó un grupo de plantas crecidas en cajas con agar medio Fahareaus (sin nitrógeno) con suspensiones de rizobios. Otro grupo de plantas se inoculó con medio de cultivo YEM como control. Se cosecharon las raíces de 6 plantas por cada uno de los tratamientos después de 24 horas desde su inoculación. Los valores de expresión se normalizaron por los del factor de elongación *EF-1α*. Los SD corresponden a 3 réplicas técnicas.

Se detectó acumulación de transcriptos en las raíces inoculadas comparado con el tratamiento control consistente en raíces sin inocular. Este resultado concuerda con lo reportado previamente por Peltzer Meschini *et al.*, (2008). También, se detectaron diferencias en los niveles de acumulación en raíces inoculadas con la cepa CE3 y la SC15. La cepa CE3 indujo niveles superiores de transcriptos en todos los genes ensayados. La cepa mutante *noIL* provocó una acumulación por encima del nivel detectado en el control pero inferior a cualquiera de las dos cepas silvestres ensayadas. Estos resultados nos estarían indicando que modificaciones puntuales tal como la acetilación del LCO afecta negativamente el nivel de

expresión de genes que se activan específica y tempranamente en respuesta a la infección con el hospedante.

Discusión de resultados y conclusiones

P. vulgaris es una de las leguminosas que puede ser nodulada por un grupo muy heterogéneo de rizobios (Pinero *et al.*, 1998, Romero *et al.*, 1991, Segovia *et al.*, 1993). Además, poroto expresa afinidad entre genotipos de poroto pertenecientes a los centros de diversificación y los linajes de *R. etli* que predominan en cada uno de esos centros. Para desarrollar aún más la caracterización de esta interacción genotipo de poroto x linaje de rizobio, encaramos la búsqueda de correlación entre esta afinidad y elementos implicados en el diálogo molecular entre el rizobio y el hospedador, específicamente sobre la principal molécula señal producida por el microsimbionte.

El amplio espectro de rizobios capaces de nodular poroto implica que esta planta tiene la capacidad de reconocer una diversidad de factores de nodulación, ya que los microsimbiontes compatibles de poroto sintetizan una variada gama de LCOs. Por ejemplo, *Rhizobium* sp. GRH2 produce LCOs con metilo ó hidrógeno en R1, y sulfato ó hidrógeno en R4 (López-Lara *et al.*, 1995), mientras que los producidos por la cepa de *R. etli* CFN42 poseen metilo en R1, un grupo carbamoil en R2 y acetil fucosa en R4 (Cárdenas *et al.*, 1995; Pacios-Bras, 2002). A pesar de la variedad de LCOs que es capaz de reconocer poroto, en la gran mayoría de los cultivares se observa una mayor inducción de la formación de nódulos en las interacciones con rizobios que producen LCOs con fucosa como sustituyente en el extremo reductor, seguido en orden decreciente de eficiencia por arabinosa, sulfato e hidrógeno (Laeremans *et al.*, 1999). Otra cepa de *R. etli*, KIM5s, sintetiza LCOs muy distintos a los de *R. etli* CFN42, consistentes en oligómeros de 6 unidades de NAcGlc, con ácido vaccénico y un grupo metilo en el extremo no reductor como únicos sustituyentes (Pacios-Bras *et al.*, 2002). A pesar de la baja complejidad de sus LCOs, esta cepa es muy competitiva por la ocupación de nódulos (Josephson *et al.*, 1984; Streit *et al.*, 1992), por lo que las decoraciones de los LCOs *per se* no es un parámetro que está asociado directamente en la mejora de la eficiencia de nodulación ni la competencia por la ocupación de nódulos. En otras asociaciones simbióticas, la acetilación tiene un efecto significativo (*M. loti-L. japonicus*), ya que mutantes en el gen *noIL* pierden la capacidad de nodular algunas especies de Lotus (Rodpothong *et al.*, 2009).

Encontramos que los LCOs producidos por cepas de ambos linajes son esencialmente idénticos entre sí, aunque la cepa 55N1 resultó excepcional. La ocurrencia de una mutación

intrínseca en el gen *nolL* de la cepa 55N1 determinaría una deficiencia funcional requerida para acetilar el residuo fucosil del extremo reductor. La ausencia de acetilación no compromete la capacidad de *R. etli* para nodular poroto, sin embargo las cepas que no lo acetilan son menos competitivas que las cepas que los producen acetilados. La comparación de los resultados de competencia entre cepas *nodC-α* y *nodC-δ*, ambas carentes del residuo acetilo, demostraron que no se altera la afinidad entre el poroto variedad mesoamericana Nag12 y la cepa *nodC-α*. Resulta entonces interesante señalar que la acetilación es importante para la competencia entre cepas que producen LCOs acetilados, pero no es importante para la competencia de cepas *nodC-α* frente a cepas *nodC-δ* que producen LCOs no acetilados.

Podemos concluir que la acetilación del fucosil de los LCOs no es un indicador de la coevolución, ya que resultó ser un rasgo asociado a cepas de *R. etli nodC-α* y *nodC-δ*. Estos datos nos permiten especular que los rizobios, en el proceso de coevolución con el poroto en los respectivos centros de diversificación, sufrieron cambios en otras moléculas de señalización secundaria que no involucran a la estructura de los factores de nodulación. Otras especies también nodulantes de poroto presentan otros sustituyentes en el extremo reductor tales como sulfato (*R. tropici*, *Sinorhizobium* sp. BR816). Un caso más divergente aún lo representa la cepa KIM5s de *R. etli*, ya mencionada (Pacios-Bras *et al.*, 2002).

Las respuestas moleculares tempranas resultan afectadas negativamente teniendo en cuenta que la infección con el mutante *nolL* indujo niveles comparativamente bajos de transcritos de un conjunto de genes del poroto. Se podría especular que el LCO en su forma acetilada, tiene un mejor ajuste con el receptor del poroto, lo cual resulta en una respuesta más eficiente de los genes de nodulación. Estos resultados permiten suponer que además de la estructura del NF existirían otros puntos de control determinantes de la afinidad entre cepas y porotos mesoamericanos.

Capítulo 3

Análisis de genes de P. vulgaris expresados diferencialmente en respuesta a cepas de R. etli

Como se describiera en la introducción de esta tesis, la inoculación de raíces de poroto pertenecientes al centro mesoamericano de domesticación con cepas de rizobio correspondientes a los linajes *nodC-α* y *nodC-δ* induce genes en la planta en forma diferencial (Peltzer Meschini *et al.*, 2008). En función de la homología de secuencia obtenida en un análisis usando BlastX se seleccionaron 4 de ellos para una caracterización más detallada (Tabla 3.1).

Cóntigo tentativo ^a	Blast X ^b	Valor E ^c
<i>PvRHS24-17</i>	VHS and GAT domain-containing protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	7 e ⁻⁹⁵
<i>PvRHS24-25</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (<i>Ricinus communis</i>)	2 e ⁻¹²⁸
<i>PvRHS24-26</i>	Putative Kunitz trypsin protease inhibitor (<i>Glycine max</i>)	7 e ⁻⁸⁸
<i>PvRHS24-43</i>	LEDI-5c protein (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)	5 e ⁻⁴³

Tabla 3.1. Asignación funcional de 4 de los 41 cóntigos tentativos (TCs) de la biblioteca substractiva de pelos radicales de *P. vulgaris* inoculados con SC15 versus 55N1. **a:** La denominación de los cóntigos *PvRHS24-X* hace referencia a *Phaseolus vulgaris Root Hair Subtraction 24 hs post inoculation*. **b:** secuencia con menor valor E en la base de datos no redundante (nr).del NCBI. **c:** *Expectation value*: probabilidad de encontrar una secuencia determinada dentro de una base de datos por azar y cuya magnitud depende de la secuencia en cuestión, de su tamaño y de la robustez de la base de datos utilizada.

Caracterización de los genes diferenciales mediante análisis filogenético y de secuencia

Para cada una de las secuencias de poroto en estudio se hizo un análisis mediante BlastN para detectar otras secuencias de la misma especie en las bases de datos de ESTs del sitio “*Plant genome Database*”, de forma de extender los clones parciales obtenidos de la biblioteca sustractiva. Así, se logró extender solamente la secuencia del *PvRHS24-17*, originalmente de 727 bp a 1295 bp, mientras que la extensión de la secuencia de los cóntigos *PvRHS24-25*, -26 y -43 se mantuvo en 633, 1108 y 548 bp, respectivamente.

Con el fin de estudiar la posible función molecular de estos genes se realizó una búsqueda por homología de secuencia en las bases de datos disponibles y el posterior alineamiento con las

secuencias proteicas con mayor porcentaje de similitud de secuencia de otras especies vegetales, tanto leguminosas como no leguminosas.

✓ ***PvRHS24-17* codifica para una proteína con homología a la familia GGA**

Se utilizó el programa *BlastX* para identificar secuencias similares a *PvRHS24-17* en la base de datos nr del NCBI. Las proteínas con mayor similitud de secuencia correspondieron a varias GGA de plantas (por las siglas en inglés: *Golgi-localized, γ -ear-containing ARF-binding*). Estas proteínas comenzaron a estudiarse en los últimos años (Boman *et al.*, 2000) y desde entonces han sido caracterizadas tanto estructural como funcionalmente (Bonifacino, 2004). Constituyen una familia de proteínas que se unen a la cara citoplasmática del *trans*-Golgi, en donde participan del tráfico de proteínas hacia endosomas/lisomas y se hallan asociadas a vesículas de clatrina (Boman *et al.*, 2000, Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001). Están organizadas en cuatro dominios: **1**) el VHS, localizado en la región N-terminal, y que se encuentra conservado en varias proteínas implicadas en endocitosis y transducción de señales aunque no tienen una función asignada hasta el momento, **2**) el dominio GAT, de aproximadamente 150 aminoácidos, que interacciona con GTPasas monoméricas de la familia de las ARFs (ADP ribosylation factors) activadas (Boman *et al.*, 2001), lo que provoca la translocación de las GGA al TGN (*trans*-Golgi Network) y que es suficiente para establecer la localización subcelular de las proteínas GGA (Hirst *et al.*, 2007); **3**) un dominio “*hinge*” o tipo puente, que no se halla conservado entre las GGA y que es el que uniría a clatrina; **4**) y por último, hacia el extremo carboxilo terminal, el dominio GAE, con homología a las *γ -adaptin ear*. El análisis de la secuencia de *PvRHS24-17*, así como en las proteínas homólogas de otras especies de plantas, reveló la presencia de sólo dos de estos dominios funcionales: VHS y GAT.

Se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de *PvRHS24-17* y sus homólogos de otras especies utilizando ClustalW (**Figura 3.1**). Tanto el resultado del Blast como la alta conservación de secuencia entre las diferentes especies sugiere que el clon de *P. vulgaris* codificaría para una GGA. En función de estos resultados, el clon *PvRHS24-17* fue renombrado como *PvGGA1*.

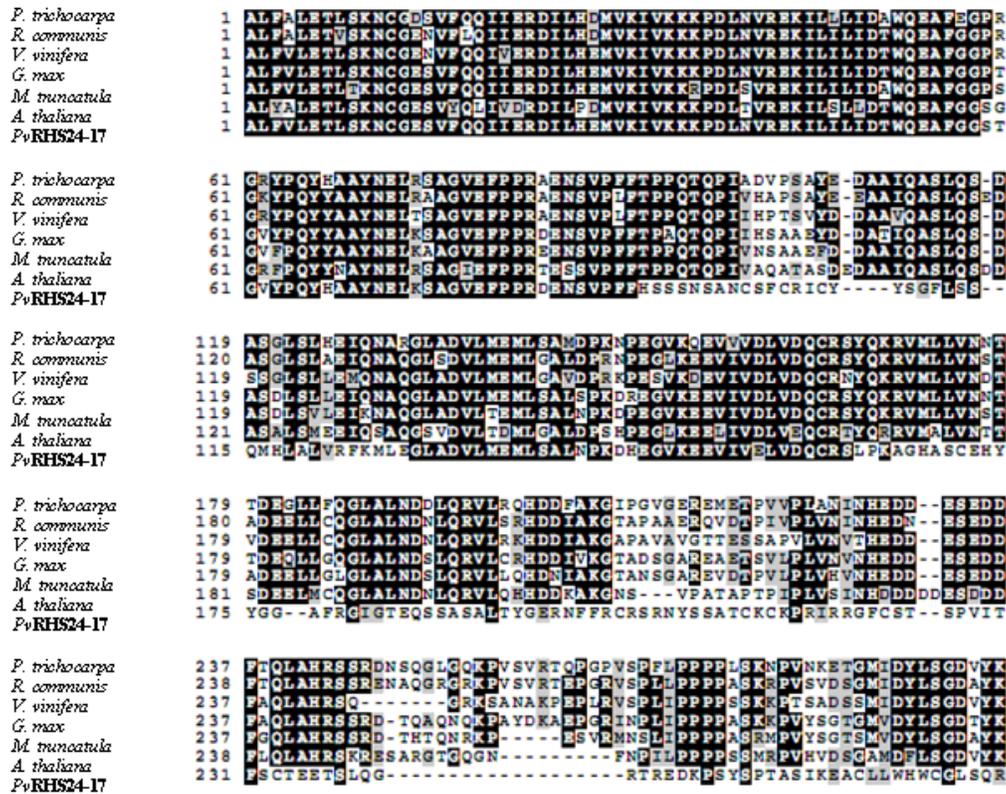


Figura 3.1. Alineamiento de PvHS24-17 (PvGGA1), con GGAs de las de diferentes especies de plantas. Las siguientes secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la bases de datos nr del NCBI: *Populus trichocarpa* (álamo) XP_002300956.1; *Ricinus communis* (ricino) XM_002520224.1; *Vitis vinifera* (vid) XM_002285858.1; *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) NM_101990.3; *Glycine max* (soja) DQ287691.1; *Zea mays* (maíz) BT088390.1. El alineamiento se generó con el programa Clustal W y formateó con BOXSHADE.

✓ **PvRHS24-25 codifica para una proteína de la familia de las inmunofilinas**

Un análisis similar al realizado con PvGGA1 mostró que la proteína codificada por PvRHS24-25 presenta una elevada similitud de secuencia con inmunofilinas de otras especies de plantas. Estas proteínas poseen actividad “peptidilprolil isomerasa” (PPIasa) que interviene en la rotación del enlace peptídico previo a la prolina, sugiriendo que estas chaperonas cumplen un papel importante en el plegamiento de proteínas *in vivo*. La familia de las inmunofilinas se pueden dividir en dos subfamilias: las ciclofilinas (Cyps), que son proteínas de unión a ciclosporina A, presentes en mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias (Fanghanel & Fisher, 2004; Kuo *et al.*, 2004) y las FKBP, que se unen a FK506 y a rapamicina, un grupo ubicuo de proteínas que se conocen por su efecto inmunosupresor en mamíferos (Schiene *et al.*, 2000; Harrar *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2005). Las funciones de las inmunofilinas son variadas, e incluyen señalización y control del ciclo celular (Heitman *et al.*, 1991; Kunz & Hall, 1993). La secuencia aminoacídica del clon parcial de PvRHS24-25 se comparó con las de otras especies de plantas con las que presentó homología y que codifican para ciclofilinas (**Figura 3.2**).



Figura 3.2. Alineamiento de la ciclofilina de poroto, *PvRHS24-25*, con las de diferentes especies de plantas. Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas en la bases de datos nr del NCBI: *Lotus japonicus* (lotus) AK338701.1; *Medicago truncatula* (medicago) BT052930.1; *Phaseolus vulgaris* (poroto) *PvRHS24-25*; *Glycine max* (soja) AK245013.1; *Arachis hypogaea* (maní) EZ723527.1; *Vitis vinifera* (vid) XM_002268125.1; *Lycopersicon esculentum* (tomate) BT012788.1. El alineamiento se generó con el programa Clustal W y formateó con BOXSHADE.

✓ ***PvRHS24-26* codifica para una un inhibidor de proteasa**

A partir del análisis comparativo de la secuencia *PvRHS24-26* con la base de datos usando el algoritmo BlastX se dedujo que dicha secuencia de *P. vulgaris* codificaría para un posible inhibidor de proteasas de tipo Kunitz (*putative Kunitz trypsin protease inhibitor*) (Ryan, 1990; Richardson, 1991). Presenta un porcentaje de similitud de secuencia de hasta un 84% con las proteínas de otras leguminosas, como Lotus, Medicago y soja, mientras que comparada con la secuencia de Arabidopsis, la similitud es del 41%.

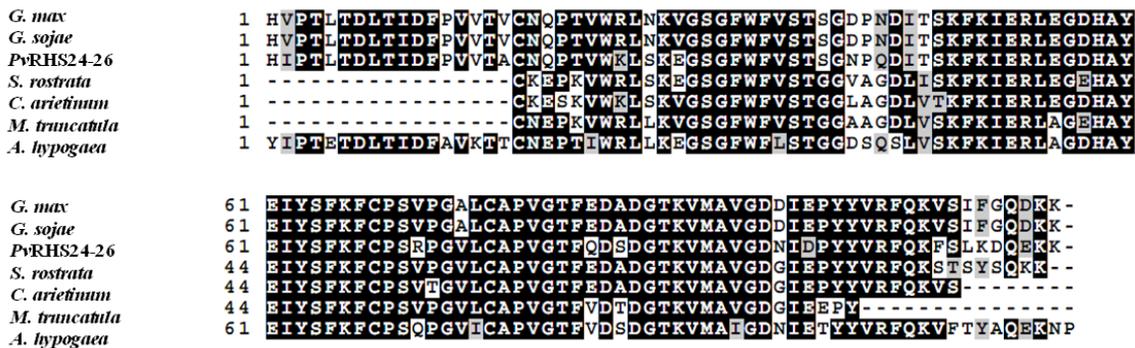


Figura 3.3. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *PvRHS24-26* con las de diferentes especies de plantas. Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas en la bases de datos nr del NCBI. *Glycine max* (soja) gb|EU444601.1; *Glycine sojæ* (soja) BT089152.; *Phaseolus vulgaris* (poroto) *PvRHS24-26*; *Sesbania rostrata* (sesbania) AJ441323.1; *Cicer arietinum* (garbanzo) AJ850055.1; *Medicago truncatula* (medicago) CU019604.4 y *Arachis sp.* El alineamiento se generó con el programa Clustal W y formateó con BOXSHADE

En la literatura se registran pocos trabajos que involucren a inhibidores de proteasas asociados a la simbiosis, en particular, a la nodulación. Lievens *et al.*, (2004) estudiaron un inhibidor de proteasas de tipo Kunitz que se induce específicamente durante la nodulación en la leguminosa *S. rostrata*. En particular, la proteína que identificaron fue una de las que mayor homología presentó con la proteína codificada por PvRHS24-26 (ver el alineamiento de la **Figura 3.3**).

✓ **PvRHS24-43 codifica para una enzima de la vía de síntesis del ácido jasmónico**

La comparación de la secuencia de PvRHS24-43 con la base de datos mediante BlastX mostró que dicha secuencia de poroto posee alta similitud con una enzima asociada a la ruta biosintética del ácido jasmónico, la OPR3 (por 12-oxo-fitodienoato reductasa), que participa en la cuarta etapa de la vía de síntesis del ácido jasmónico, y cataliza la conversión del ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) a 3-oxo-2-(2'-pentenil) ciclopentano-1-ácido octanoico (OPC-8:0). Los jasmonatos son fitohormonas lipídicas, derivados oxigenados de los ácidos grasos linoleico y linolénico que actúan como señales moleculares de la respuesta a numerosas situaciones de estrés y también participan en diversos procesos de desarrollo (Wasternack *et al.*, 2006).



Figura 3.4. Alineamiento parcial de la secuencia aminoacídica codificada por PvRHS24-43 con las de diferentes especies de plantas. Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la bases de datos nr del NCBI. *Vitis vinifera* (vid) XM_002281083.1; *Arachis duranensis* HP003835.1; *Lithospermum erythrorhizon* AB108499.1; *Populus trichocarpa* XM_002327253.1; *Glycine max* AC172299.9; *Glycine sojae* BT095686.1; *Phaseolus vulgaris* PvRHS24-43. El alineamiento se generó con el programa Clustal W y formateó con BOXSHADE.

☑ Análisis de la expresión de los clones diferenciales seleccionados en raíces de la variedad Mesoamericana Nag12

El patrón diferencial de expresión se corroboró a través de la técnica de *qRT-PCR* en raíces del cultivar Nag12 inoculadas individualmente con las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. Como control, un grupo de plantas fueron tratadas con el medio de cultivo de los rizobios, YEM.

Los resultados de la validación de la expresión diferencial se muestran en la **Figura 3.5**. Para los cuatro clones analizados, el nivel de transcritos acumulados fue superior en aquellas raíces que fueron inoculadas con la cepa *R. etli* SC15 respecto de las inoculadas con la cepa 55N1, o las plantas control inoculadas con el medio de cultivo empleado para el crecimiento de los rizobios.

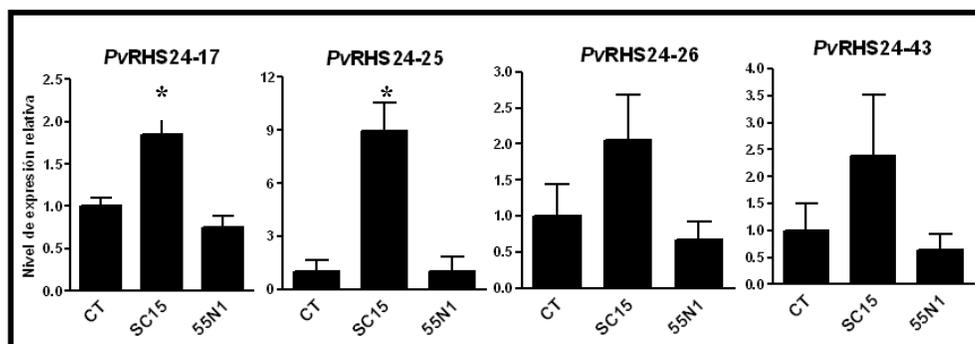


Figura 3.5. Acumulación diferencial de transcritos en respuesta a la infección con cepas pertenecientes al alelo *nodC-α* (SC15) y *nodC-δ* (55N1). Raíces de *P. vulgaris* cv. Nag12 fueron inoculadas con medio YEM como control (CT) o con las cepas de *R. etli* SC15 ó 55N1. A las 24 hpi se extrajo RNA de las raíces y se realizaron ensayos de *qRT-PCR*. Los niveles de transcritos de cada gen fueron normalizados por los valores obtenidos para el factor de elongación 1 α (*EF-1 α*) y referidos a la muestra control. En los gráficos se muestra la media \pm SD de dos replicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t-test*, $P < 0,05$).

Se observaron diferencias altamente significativas en el nivel de expresión de *PvRHS24-17* y *PvRHS24-25* en raíces inoculadas con SC15 respecto a las inoculadas con 55N1 ó YEM (*t-test*, $P < 0,05$). En cambio no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de transcritos en raíces inoculadas con 55N1 ó YEM. En *PvRHS24-26* y *-43*, también se observó una mayor acumulación de transcritos en plantas inoculadas con SC15 comparadas con las inoculadas con 55N1 ó YEM, aunque las diferencias en el nivel de expresión no fueron significativas. Estos resultados muestran que existe un reconocimiento diferencial por parte de la planta, y que se manifiesta en la expresión de un grupo de genes, de los cuales se desconoce hasta el momento la función que desempeñan en esta simbiosis.

☑ **Análisis de la expresión de los clones diferenciales seleccionados en raíces de la variedad Andina Alubia**

La expresión diferencial de los genes identificados en la hibridación sustractiva podría estar relacionado a una respuesta específica asociada al reconocimiento de la cepa de *R. etli* más afín por parte del hospedador. Sin embargo, dicha expresión diferencial podría ser consecuencia de un proceso de infección más temprano en ciertas interacciones. En el primer caso se esperaría que la respuesta haya surgido evolutivamente en uno de los pools génicos del poroto, mientras que en el segundo las diferencias serían sólo temporales y se invertirían según la afinidad entre porotos y rizobios. Por lo tanto, con el fin de evaluar la especificidad de la respuesta transcripcional de estos cuatro genes, los niveles de mRNA también fueron examinados en un cultivar andino inoculado con las mismas cepas que se utilizaron en el ensayo con el cultivar mesoamericano. La expresión de los genes *PvRHS24-17*, *PvRHS24-25*, *PvRHS24-26* y *PvRHS24-43* en raíces de poroto Alubia se cuantificó por *qRT-PCR*.

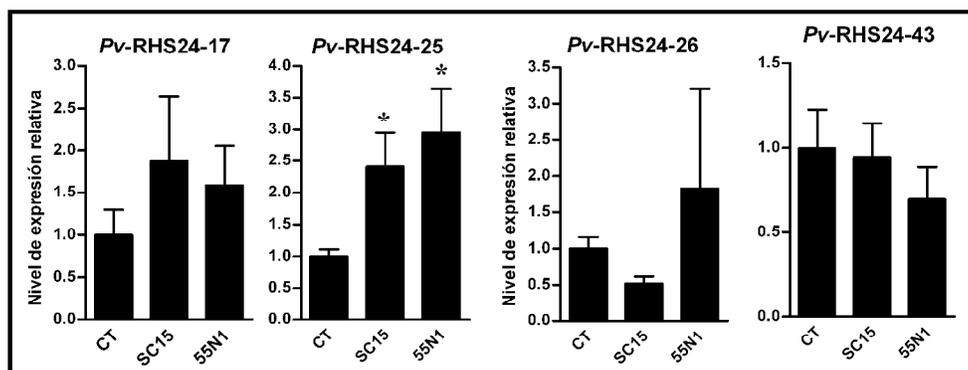


Figura 3.6. Acumulación de transcritos *PvRHS24-17*, *-25*, *-26* y *-43* en raíces de plantas Alubia inoculadas con SC15 ó 55N1. Raíces de *P. vulgaris* cv. Alubia fueron inoculadas con medio YEM como control (CT) o con las cepas de *R. etli* SC15 ó 55N1. A las 24 hpi se extrajo el RNA de las raíces y se realizaron ensayos de *qRT-PCR*. Los niveles de transcritos de cada gen fueron normalizados por *EF-1α* y relativizados al CT. En los gráficos se muestra la media \pm SD correspondiente a dos replicas biológicas.

Como se observa en la **Figura 3.6**, no hubo diferencias de expresión significativas (*t-test*, $P < 0,05$) de los genes analizados entre las plantas inoculadas y las plantas tratadas con YEM, con la única excepción del *PvRHS24-25*, cuyos niveles estacionarios se acumularon significativamente en raíces de plantas inoculadas con la cepa 55N1 y SC15.

Estos resultados mostraron una respuesta diferente a la observada en el caso del poroto mesoamericano, indicando que la respuesta de los hospedadores, cada uno representante de los dos centros de diversificación, son diferentes entre sí y dependiente de la cepa de rizobio.

Los genes identificados, por lo tanto, podrían formar parte de la respuesta que se genera en plantas mesoamericanas ante la presencia de rizobios que han coevolucionado, resultando en una interacción más eficiente. En función de esta hipótesis se procedió al estudio de uno de los clones, *PvRHS24-17*, con el fin de establecer su rol en la preferencia de cepas por parte de la planta hospedante.

☑ **Estudios de expresión de *PvGGA1***

✓ **Los transcritos de *PvGGA1* se acumulan diferencialmente también frente a otras cepas de *R. etli nodC-α***

Como ya se mostró en la **Figura 3.5**, el transcripto de la *PvGGA1* se acumula diferencialmente en respuesta a la inoculación con SC15 en raíces de plantas de poroto de la variedad mesoamericana Nag12, mientras que no hubo cambios significativos en la variedad andina Alubia (**Figura 3.6**).

Para evaluar si el aumento de los niveles estacionarios de mRNA de este gen en la variedad mesoamericana es consecuencia de una respuesta a las cepas de rizobio predominantes en el mismo centro de diversificación se inocularon plantas de poroto Nag12 con otras cepas de *R. etli* representantes de los linajes *nodC-α* y *nodC-δ* y se cosechó el material a las 24 hpi.

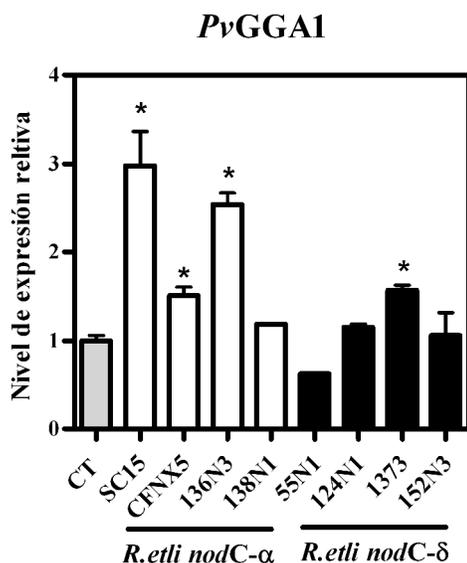


Figura 3.7. *PvGGA1* aumenta preferencialmente en respuesta a cepas representativas de la región mesoamericana. Se evaluó por *qRT-PCR* el nivel de transcripto del gen que codifica para *PvGGA1* en raíces Nag12 inoculada con SC15, CFNX5, 136N3, 138N1 (cepas de *R. etli nodC-α*) y 55N1, 124N1, 1373 y 152N3 (cepas de *R. etli nodC-δ*). A las 24 hpi se colectó el tejido y se realizó la extracción de RNA. Los datos de expresión de cada una de las muestras se normalizaron por el del gen *EF-1α* (factor de elongación 1- α). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*t-test*, $P < 0,05$).

Se observó un aumento significativo del nivel estacionario de *PvGGA1* con todas las cepas de *R. etli nodC-α* usadas en este ensayo, a excepción de la cepa 138N1, con respecto al control (**Figura 3.7**). Las cepas *nodC-δ*, con excepción de la cepa 1373, no provocaron una

acumulación significativa de este transcrito (**Figura 3.7**, barras negras). Analizadas conjuntamente, el nivel estacionario de transcrito fue mayor luego de la inoculación con cepas *nodC-α* (2.05 ± 0.41) que con cepas *nodC-δ* (1.11 ± 0.19), lo que nos estaría indicando que *PvGGA1* sería parte de una respuesta específica de cepa, generada en el reconocimiento específico de componentes moleculares de las cepas *nodC-α*.

✓ **Los transcritos de *PvGGA1* se acumulan marcadamente en tallo y raíz**

Con el propósito de estudiar el patrón de expresión de *PvGGA1* en los diferentes órganos de la planta de poroto, se cuantificó por qRT-PCR el nivel de transcrito en hojas, tallos, raíces sin inocular, y nódulos de 7 y 14 días formados en respuesta a la inoculación con las cepas SC15 y 55N1.

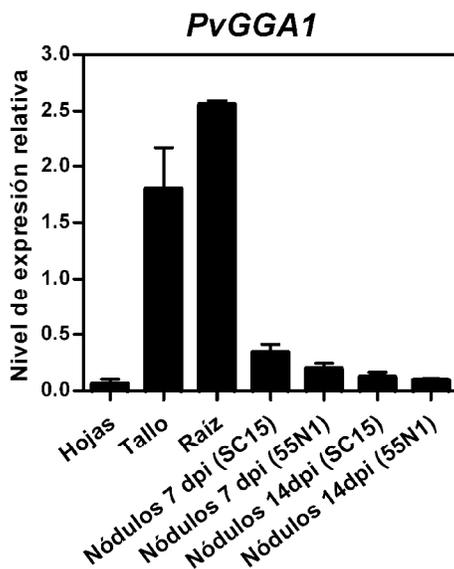


Figura 3.8. Nivel de expresión de *PvGGA1* en distintos órganos de poroto variedad Nag12. Los resultados del análisis de qRT-PCR en cada una de las muestras fueron normalizados con los valores correspondientes a *EF-1α*. La media \pm SD corresponde a 2 réplicas técnicas representativas de dos muestras biológicas independientes.

En la **Figura 3.8** se puede observar que *PvGGA1* presentó un elevado nivel de expresión en raíz y tallo en comparación a hoja. Por otro lado, en nódulos de 7 y 14 días formados luego de la inoculación con la cepa SC15, el nivel de transcritos fue superior que con la cepa 55N1. Si se comparan estos datos con los de expresión de los respectivos homólogos de *A. thaliana* y *M. truncatula* que se describen más adelante, se observa que hay cierta correlación, ya que el máximo de expresión ocurre en raíz, y no se observan diferencias marcadas en las diferentes etapas de maduración del nódulo.

✓ La expresión de *PvGGA1* requeriría de la presencia del factor Nod, del lipopolisacárido y de la producción de exopolisacárido por parte del rizobio

Con el fin de identificar las moléculas de señalización del rizobio requeridas para la inducción de *PvGGA1* se utilizaron cepas mutantes de *R. etli* derivadas de CE3 deficientes en moléculas que participan en el intercambio de señales con la planta (Noel *et al.*, 1986, Eisenschenk *et al.*, 1994).

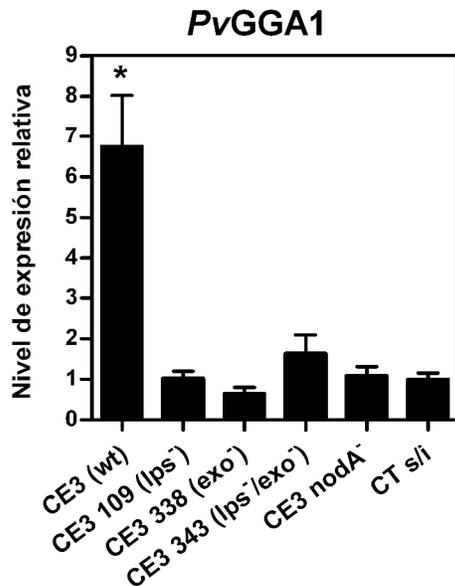


Figura 3.9. El aumento de *PvGGA1* en respuesta a rizobio requiere de la señal primaria (factor Nod) y señales secundarias. Los niveles de transcritos de *PvGGA1* fueron medidos mediante qRT-PCR en raíces de *P. vulgaris* NAG12 inoculadas con distintas cepas de *R. etli* derivadas de CFN42. Plantas de 7 días fueron inoculadas con cultivos de las cepas CE3 (CFN42 resistente a Sm); CE109 (deficiente en la síntesis de lipopolisacárido, lps⁻); CE 338 (deficiente en la síntesis de exopolisacárido, exo⁻); CE 343 (lps⁻/exo⁻); CFN42 (deficiente en la síntesis de factor Nod, nodA⁻), o tratadas con YEM (control sin inocular, CT s/i). A las 24 hs se colectó el tejido de dos plantas por cada tratamiento, se purificó el RNA, se sintetizó cDNA y se realizaron las reacciones de qRT-PCR. Los datos de expresión se normalizaron por el de *EF-1α* y se expresaron relativos al control sin inocular. El asterisco indica una diferencia significativa respecto al control sin inocular (*t-test*, P<0,05).

En la **Figura 3.9** se puede observar que la inoculación con la cepa control CE3 fue la única que provocó la acumulación de transcritos de *PvGGA1*, mientras que la inoculación con las cepas CE109 (deficiente en la síntesis de lipopolisacárido, lps⁻), CE 338 (deficiente en la síntesis de exopolisacárido, exo⁻), CE 343 (lps⁻/exo⁻), y CFN42 (deficiente en la síntesis de factor Nod, nodA⁻) no modificó la expresión del *PvGGA1* respecto del control sin inocular. Estos resultados muestran que la presencia del factor Nod, del lipopolisacárido y de la producción de exopolisacárido por parte del rizobio es necesaria para el aumento del mRNA de *PvGGA1* en las raíces inoculadas.

✓ Los niveles estacionarios de transcritos de *PvGGA1* aumentan en respuesta a citoquininas

Recientes estudios han mostrado la relación existente entre las fitohormonas y la morfogénesis del nódulo (Tirichine *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2005; Gonzalez-Rizo *et al.*, 2006; Wasson *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007).

Las denominadas hormonas de estrés/defensa, como etileno, ácido salicílico (SA), jasmónico (JA), y absícico (ABA) regulan negativamente muchas de las respuestas epidérmicas, inhibiendo el proceso de nodulación (revisado en Oldroyd & Downie, 2008). Por ejemplo, se puede citar el efecto que posee el JA, que inhibe el “*calcium spiking*” y la transcripción de las nodulinas como *RIP* y *ENOD11* (Sun *et al.*, 2006), además de otros genes relacionados con la nodulación (Sembdner & Parthier, 1993). El metil jasmónico tendría el mismo efecto inhibitorio en la nodulación (Nakagawa & Kawaguchi, 2006). El proceso de infección estaría inhibido por etileno en los pasos del *calcium spiking* y formación del IT (Oldroyd *et al.*, 2001; Penmetsa *et al.*, 2003). La aplicación de SA retarda y disminuye la nodulación en alfalfa inoculada con *S. meliloti*, y disminuye la expresión de *RIP* (Stacey *et al.*, 2006).

Las aplicación de citoquininas, en cambio, induce respuestas similares a las provocadas por los factores Nod, como división de células corticales que dan lugar a la formación del primordio (Lohat *et al.*, 2004), inducción de la expresión de *ENOD40* (Mathesius, 2000) y otras nodulinas tempranas (Cooper & Long, 1994; Bauer *et al.*, 1996; Fang & Hirsch, 1998; Lorteau *et al.*, 2001). Mutantes de *L. japonicus* con ganancia de función en el receptor de citoquininas, *LHK1*, nodulan espontáneamente (Tirichine, 2007).

En este ensayo se propuso estudiar si la expresión de *PvGGA1* está relacionada a las respuestas generadas en la planta tras la aplicación exógena de hormonas. Sólo se observó una diferencia significativa entre el control y la muestra tratada con citoquinina (BAP). El resto de

los tratamientos no presentó diferencias respecto del control sin inocular (Figura 3.10).

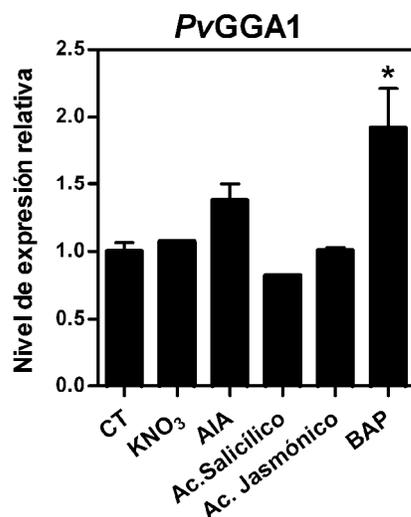


Figura 3.10. *qRT-PCR* de *PvGGA1* en raíces de *P. vulgaris* var. Nag12, tratadas con hormonas o KNO₃. Plantas de 7 días fueron rociadas en la raíz con 1 ml de: 0,1 % v/v DMSO (control); 8 mM KNO₃; 100 μM ácido salicílico; 100 μM ácido jasmónico; 2 μg/ml ácido indol acético (AIA); 0,5 μg/ml bencil amino purina (BAP). A las 24 horas se colectó el RNA, que fue empleado como molde en las reacciones de *qRT-PCR*. Los valores de expresión se normalizaron por EF-1α, y se expresan como valores relativos a la muestra control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*t-test*, P<0,05).

La nodulación también está controlada negativamente por factores externos, como la disponibilidad de nitrato. En vista del efecto negativo que ejerce el nitrato en el

establecimiento de la simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno, nos propusimos estudiar el rol de este compuesto nitrogenado en la expresión de *PvGGA1*, que se induce específicamente en respuesta a la inoculación con rizobios. Sorpresivamente, la expresión de este gen no fue inhibida por la presencia de nitrato, ya que la presencia de KNO_3 en el medio de cultivo no produjo cambios en los niveles estacionarios de *PvGGA1* (**Figura 3.10**).

✓ **Expresión de los ortólogos putativos de *PvGGA1* en otras especies**

Las proteínas GGA se encuentran ampliamente distribuidas en metazoarios, hongos, plantas y bacterias. Con el propósito de investigar el rol que desempeñan estas proteínas en otras especies vegetales, se identificaron las proteínas con mayor similitud de secuencia en la planta modelo *A. thaliana*, y en una leguminosa modelo, *M. truncatula*. Una búsqueda a través de BlastP de la base de datos de “*The Arabidopsis Information Resource*” (TAIR) permitió identificar la secuencia AT1G21380 como aquella que presentó la máxima identidad con *PvGGA1*. El gen de *Arabidopsis* codifica para una proteína de 506 aminoácidos con dominios VHS y GAT. A partir de ensayos de expresión disponibles en el sitio de Internet: www.bar.utoronto.ca (*The Bio-Array Resource for Plant Biology*) en el que se disponen de datos de microarreglos se pudo analizar la expresión de este gen en diversas condiciones (**Figura 3.11**). Presenta niveles elevados de expresión en los últimos estadios de floración y formación de la semilla, y en determinados tejidos, principalmente en epidermis de la raíz en estadio III de maduración, cotiledón y en hojas en células del mesófilo y células guardianas, que son las que rodean a las células del estoma. Prácticamente no se ven alterados los niveles de expresión frente a tratamientos con diversas hormonas y estrés abiótico, aunque sí frente a una serie de estreses bióticos.

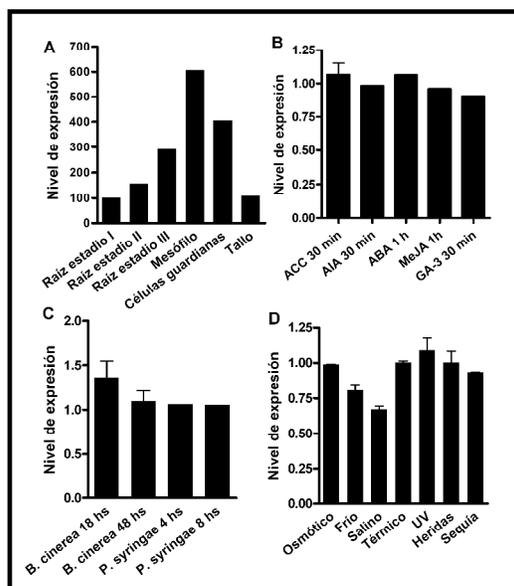


Figura 3.11. Nivel de expresión de *At1g21380*. Los valores de expresión de los microarreglos se refirieron al tratamiento control en los casos de los datos B-D. **(A)** Niveles de expresión en diferentes tejidos (Birnbaum *et al.*, 2003). **(B)** Niveles de expresión ante el tratamiento con hormonas: ACC (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico precursor de etileno, precursor del etileno); AIA: ácido indol acético; ABA: ácido absísico; MeJA: metil jasmónico; GA-3: ácido giberélico 3 (Goda *et al.*, 2008). **(C)** Niveles de expresión en estrés biótico: inyección de hojas con *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae* (Dong, X.). **(D)** Niveles de expresión en estrés abiótico: Osmótico: manitol 300 mM; Frío: 4° C; Salino: 150 mM NaCl; Térmico: 3 h a 38°C seguido de recuperación a 25°C; UV: 15 min de exposición a luz UV-B; Heridas: punción de la hoja con agujas; Sequia:

exposición 15 min a corriente de aire hasta pérdida del 10% del peso fresco.

Además, se procedió también a la búsqueda del gen con mayor homología a PvGGA1 en *Medicago truncatula*. El sitio de Internet que se usó fue el *Gene Expression Atlas* (<http://mtgea.noble.org/v2>, Benedito *et al.*, 2008), identificándose la secuencia Mtr.37830.1.S1 como la de mayor similitud de secuencia a la de PvGGA1. Su nivel de expresión es bajo en hojas, y no presenta cambios en los niveles de expresión en presencia o con déficit de fuentes nitrogenadas, como amonio o nitrato. Al igual que su homólogo de *A. thaliana*, el máximo de expresión se encuentra en raíces. En nódulos también se expresa, independientemente de si se encuentra o no fijando, esto es, dependiendo del grado de madurez del mismo. No cambia el patrón de expresión en raíces micorrizadas (**Figura 3.12**).

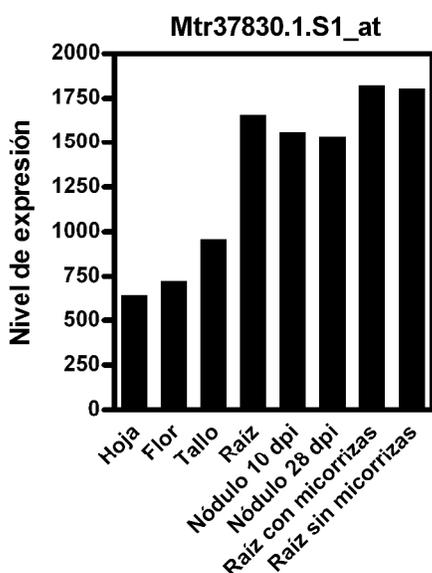


Figura 3.12. Nivel de expresión de Mtr37830.1.S1_at en diferentes órganos de *Medicago*. Los valores de expresión se obtuvieron de experimentos de microarray en el *M. truncatula* *Gene Expression Atlas* (Benedito *et al.*, 2008).

Análisis funcional mediante genética reversa

Se pudo comprobar mediante análisis por *qRT-PCR* que el nivel de transcritos de los cuatro genes seleccionados de la SSH aumenta específicamente en respuesta a la inoculación con la cepa SC15 de *R. etli*. Estos datos apoyan la hipótesis de que existen determinantes moleculares que han evolucionado conjuntamente en ambos simbioses y que participan en el reconocimiento específico, por lo que se propuso caracterizar funcionalmente los genes de la planta involucrados en dicho proceso mediante genética reversa.

En el laboratorio hemos puesto a punto el procedimiento de generación de raíces transgénicas de poroto a partir del protocolo previamente descrito por Estrada Navarrete y colaboradores (2006). Se empleó el sistema de transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, con

el que se obtienen plantas compuestas, que poseen una porción aérea salvaje y raíces transgénicas. Los pasos seguidos se muestran en la **Figura 3.13**.

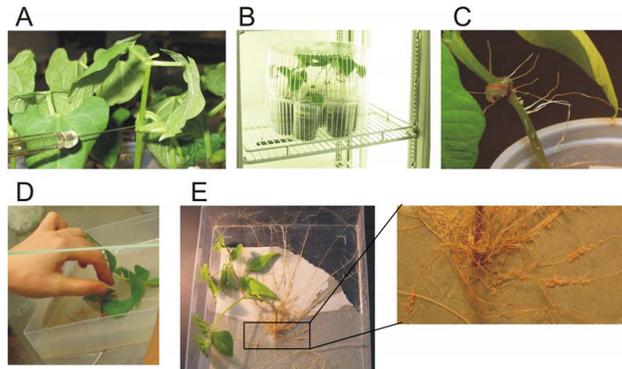


Figura 3.13. Generación de raíces transgénicas de poroto mediante transformación con *A. rhizogenes*. A) Se inyectó una suspensión de *A. rhizogenes* K599 en el nudo cotiledonar. B) Transferencia a cámara de crecimiento de plantas en cámara húmeda. C) Emergencia de raíces transgénicas de (*hairy roots*) en la zona inoculada. D) Corte de la raíz *wild type* y transferencia a cajas plásticas. E) Nódulos formados luego de la inoculación con *R. etli*.

Esta herramienta permitió utilizar genética reversa en *P. vulgaris*, ya sea mediante la sobreexpresión de genes, como a través de la reducción de los niveles de mRNA utilizando RNA de interferencia (RNAi).

Con el fin de validar el uso de este sistema en el estudio de la función de genes en la nodulación se llevaron a cabo ensayos para confirmar que las raíces generadas (*hairy roots*) conservaban la eficiencia en la formación de nódulos en respuesta a cepas de rizobios en forma comparable a las plantas salvajes (*wild type*). Plantas de poroto fueron transformadas con las construcciones pK7GWIWG2D-*GUS* RNAi y p35S:GFP*GUS*+, correspondientes a los vectores usados como control en los ensayos de silenciamiento y sobreexpresión, respectivamente. Una vez desarrolladas las raíces transgénicas se inocularon con las cepas SC15 y 55N1, y se cuantificó el número de nódulos formados en las “*hairy roots*”.

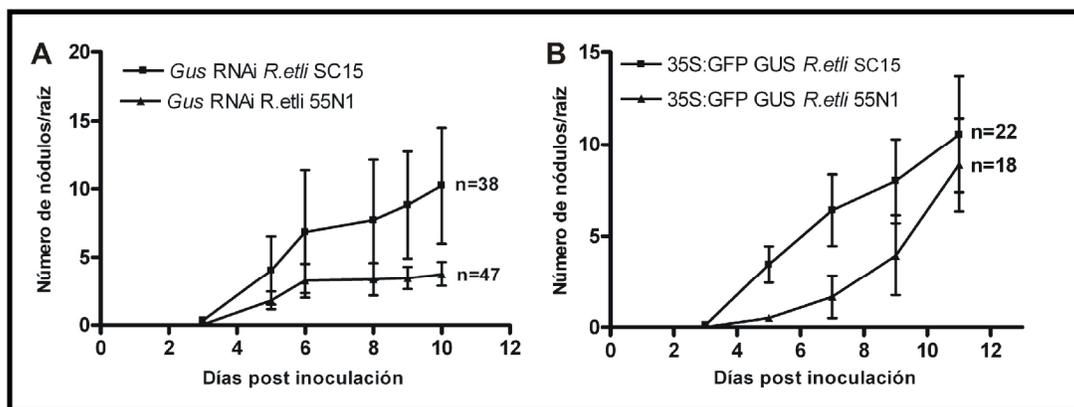


Figura 3.14. Cinética de nodulación en plantas compuestas Nag12 transformadas con *Gus* RNAi (A) y 35S:GFP GUS (B). n= número de raíces transgénicas analizadas. n: número de raíces analizadas. Se indica el valor medio del número de nódulos \pm SEM.

En la **Figura 3.14** se muestra el valor promedio del número de nódulos formados por raíz. En las cinéticas de nodulación llevadas a cabo en raíces transgénicas *Gus*RNAi y 35S:GFP GUS, se observó un mayor número de nódulos formados por la cepa SC15 en relación a 55N1, obteniéndose un patrón de nodulación similar al observado en plantas salvajes. Resulta importante destacar, entonces, que el uso de plantas transgénicas de poroto constituye un modelo válido para examinar el rol de genes usando genética reversa. En este sentido, es de esperar, por lo tanto, que si los genes identificados en la SSH participan del proceso de nodulación, particularmente en las etapas tempranas de la interacción, y/o en el reconocimiento de cepas del mismo origen geográfico, se vea reflejado en el fenotipo de las plantas con niveles reducidos de los transcritos en cuestión.

Posteriormente, se obtuvieron plantas transgénicas transformadas con construcciones que generan transcritos tipo “*hairpin*”, u horquilla. Estas estructuras son procesadas por enzimas *dicer-like*, generándose pequeños RNAs de doble cadena. Una de las hebras de estos RNA antisentido se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), donde se reconoce el ARN mensajero complementario en el citoplasma (Hammond *et al.*, 2001; Hannon, 2002). El complejo RISC cataliza el corte del mRNA complementario, que es degradado por la maquinaria celular, disminuyendo de esa forma los niveles de transcritos del gen *target*.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el estudio funcional de *PvGGA1*. Este gen fue particularmente estudiado debido a su posible función en el tráfico de vesículas, proceso en el que también está involucrado una Rab, que fue objeto de estudio en nuestro laboratorio (Blanco *et al.*, 2009) como participante de la vía de transducción de señales en la interacción poroto-rizobio.

✓ Efecto de la reducción de transcritos de *PvGGA1* en la simbiosis

Se compararon los niveles de transcritos de *PvGGA1* en plantas *GGA1* RNAi y control *Gus* RNAi. El ensayo consistió en la extracción de RNA de raíces transgénicas de 5 plantas por condición. Se alcanzó una reducción promedio de 4 veces en los niveles de transcritos de *PvGGA1* en las plantas silenciadas respecto de las *Gus* RNAi (**Figura 3.15**).

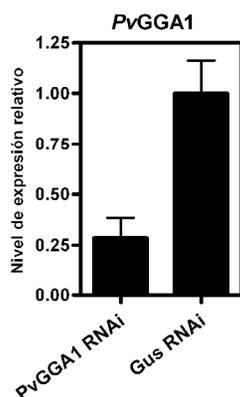


Figura 3.15. Reducción postranscripcional mediante RNAi de los niveles estacionarios de *PvGGA1* en *hairy roots* de plantas Nag12. Los niveles de expresión relativa de *PvGGA1* se compararon mediante *qRT-PCR* en raíces de plantas compuestas *PvGGA1* RNAi y *Gus* RNAi (control). Se realizó un promedio del valor de expresión de 5 plantas por construcción. Los valores se

*

normalizaron por los de *EF1-α*. Se presentan las medias \pm SD de las réplicas biológicas. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

En otro experimento independiente, en el que se emplearon 3 plantas por cada una de las construcciones también se alcanzó un nivel de reducción en los niveles de transcripto de *PvGGA1* similar. Si se consideran en conjunto los valores de expresión relativa obtenidos a lo largo de experimentos independientes, la eficiencia de silenciamiento postranscripcional alcanzó niveles entre 71 y 75 %.

El efecto de reducir los niveles de *PvGGA1* sobre la nodulación se analizó mediante la inspección de las raíces y el recuento de nódulos formados en plantas control y silenciadas (**Figura 3.16**). En las tablas suplementarias 3.1 y 3.2 pueden encontrarse los valores del número de nódulos en las variedades Nag12 y Alubia, respectivamente.

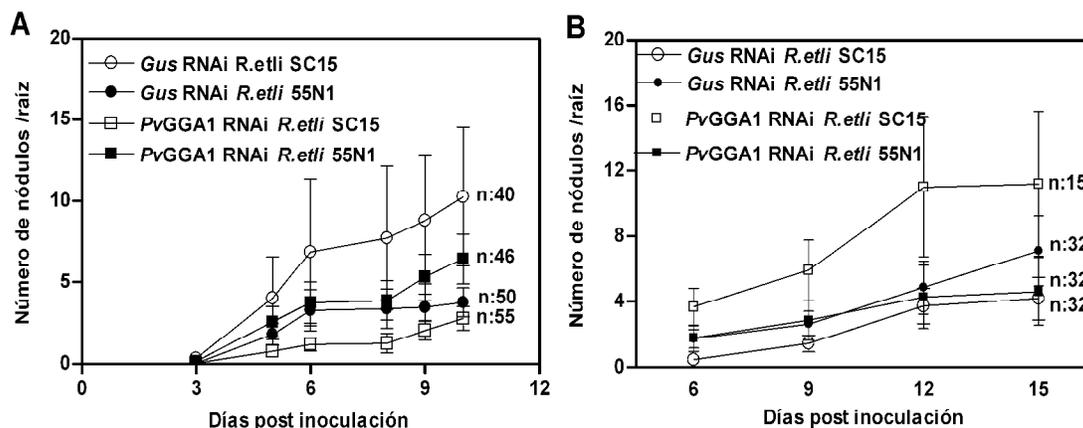


Figura 3.16. Cinética de nodulación en plantas compuestas con niveles reducidos de *PvGGA1*. Curvas de nodulación de plantas *GGA1* RNAi y control (*Gus* RNAi) de la variedad Nag12 (A) o Alubia (B) inoculadas con las cepas de *R. etli* SC15 ó 55N1. Se muestra el valor promedio \pm SD del número de nódulos. n= número de raíces analizadas por tratamiento. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Las *hairy roots* de plantas Nag12 con niveles reducidos en la expresión de *PvGGA1* que fueron inoculadas con la cepa SC15 desarrollaron un número de nódulos significativamente menor respecto de las plantas control *Gus* RNAi. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos formados en raíces de plantas transformadas con las construcciones *Gus* RNAi y *GGA1* RNAi infectadas con la cepa 55N1 (*t-test*, $P < 0.05$, **Figura 3.16**, A). Estos resultados fueron consistentes en tres experimentos independientes.

En el cultivar andino Alubia, en cambio, no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos formados en las plantas silenciadas y el control con ninguna de las cepas.

La diferencia que se observa entre el número de nódulos formados por la cepa SC15 en las dos condiciones no fue significativa debido al elevado desvío estándar (*t-test*, $P < 0.05$, **Figura 3.16, B**).

✓ **Efecto de la sobreexpresión de PvGGA1 en la simbiosis**

Para el análisis de la sobreexpresión de PvGGA1 primero se obtuvo el marco completo de lectura mediante RACE 5'.

-Obtención del marco abierto de lectura completo de PvGGA1

Con el fin de estudiar la estructura de dominios de la proteína codificada por el gen PvRHS24-17 y realizar ensayos de sobreexpresión, fue preciso obtener la secuencia codificante completa del cDNA correspondiente. Debido a la estrategia empleada para la obtención de los genes expresados diferencialmente en la biblioteca substractiva, que incluye el corte con una enzima de restricción para la obtención del cDNA, la región correspondiente al extremo 5' no se hallaba presente en el cDNA aislado. La secuencia parcial de PvRHS24-17 contenía 1295 bp, incluyendo una parte del marco abierto de lectura y la porción 3' no traducida (3' UTR). Tomando como referencia el transcripto con mayor homología detectado en la base de datos de soja, mRNA Glyma04g42250_1, que codifica para GmGGA (por *Glycine max* GGA) se estimó que faltaban aproximadamente 450 bp de la región 5' UTR. Se realizaron búsquedas mediante BlastN en la base de datos de ESTs de poroto a través del *Plant Genome Database* (<http://www.plantgdb.org/>), sin embargo no se detectaron otras ESTs que permitieran extender la secuencia hacia el extremo 5'. Por tal motivo se utilizó la estrategia de RACE 5' (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) para obtener esa porción de la secuencia. En la **Figura 3.17** se muestra un esquema del procedimiento seguido.

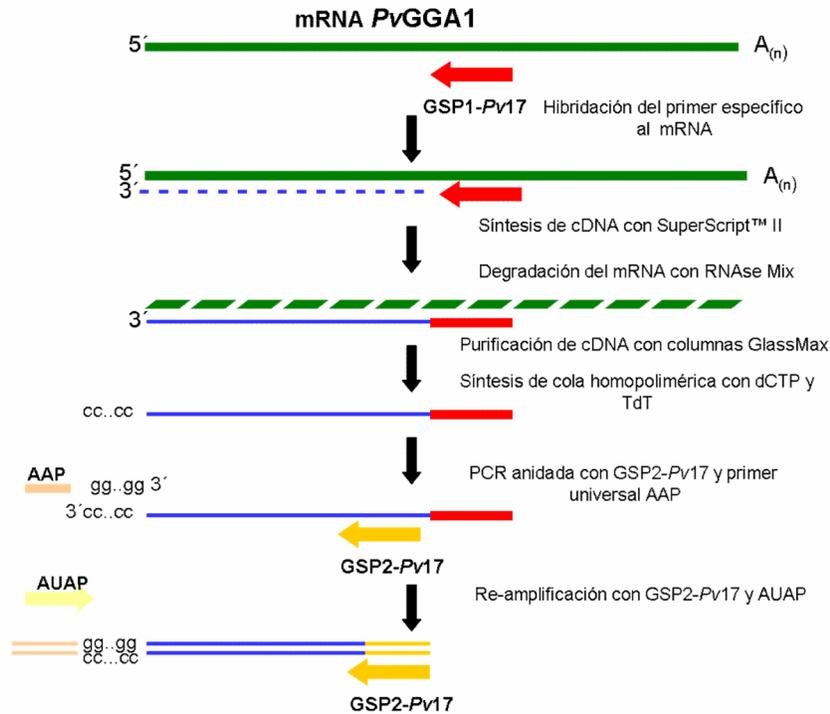


Figura 3.17. Esquema de la estrategia de 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) para obtener la secuencia del cDNA de PvGGA1. Se utilizó la estrategia sugerida por el proveedor del kit (Invitrogen). La denominación GSP1-Pv17 y GSP2-Pv17 hacen referencia a los *primers* específicos empleados para amplificar la región 5' de PvGGA1. La secuencia de ambos *primers* se encuentra en la tabla de *primers* empleados, en Materiales y Métodos.

En la primer PCR anidada, en la que se empleó un *primer* universal AAP (*Abridged Anchor Primer*), provisto por el fabricante, y un *primer* específico (GSP2-Pv17) no se obtuvo una banda definida como producto de la amplificación (**Figura 3.18, A**). En la segunda PCR, en la que se empleó como molde una dilución 1:1000 de la reacción anterior, se empleó el mismo *primer* específico GSP2-Pv17 y otro *primer* universal, AUAP. En la segunda reacción de PCR se obtuvo una banda poco definida (**Figura 3.18, B**). A partir de esta banda se purificó el ADN, que luego se utilizó en una reacción de clonado en pTOPO-TA (Invitrogen). A partir de las colonias obtenidas se realizaron ensayos de PCR con los *primers* M13 Fw y GSP2-Pv17 para verificar la presencia de insertos que contuvieran la secuencia de PvGGA1. Se detectó la presencia de insertos de diferentes tamaños (**Figura 3.18, C**). El clon # 3, que contenía un inserto de aproximadamente 850 bp, se seleccionó para analizar su secuencia.

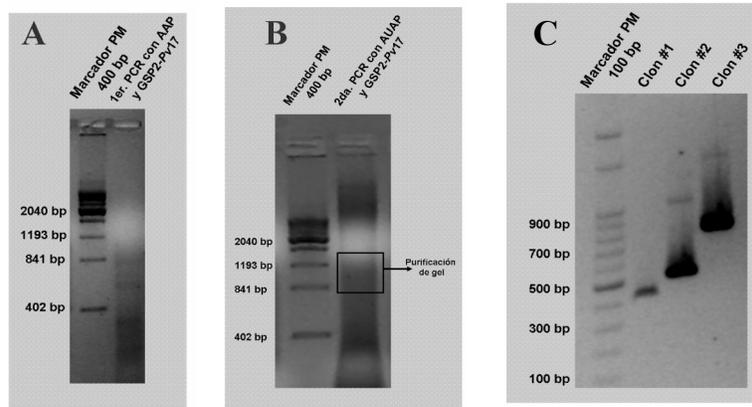


Figura 3.18 Productos de amplificación y análisis de los clones obtenidos mediante RACE. (A) Gel de agarosa 1 % en el cual se sembró 20 µl del producto de la primera reacción de PCR con *primers* AAP y GSP2-*Pv17*. **(B)** Amplificación de una dilución 1:1000 de la primer reacción de PCR, pero con otro primer universal, AUAP. A la derecha se indica la región que se cortó del gel agarosa y se utilizó para el clonado en pTOPO-TA. **(C)** *Colony* PCR de 3 clones obtenidos luego de la transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación TOPO-TA y el ADN purificado del gel de agarosa mostrado en B. Se empleó un *primer* del vector (M13 Fw) y uno específico del gen, GSP2-*Pv17*.

```

ctctagatgcatgctcgagcggccgccaagtgtgatggatatctgcagaattcggcccttggncacg
cgtcgactagtaCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGngttcngattctcanttctcttnttcttctctg
atTTtgnCncncncgga aaggTTaanannanaggga ctgactgctgganatanatagagATGG
NTAACANCCTGCTGCTGNGCTGACNNAGCANCTAGNGACATGCTCNTTGGCCCGGACTGNCCT
ATCAACNTANAGTTGNGGATATCATTAATATGGACCCGGGGCAAGCAAAGGANGCNTTGAANAT
ACTCAAAAAACGTTNGGGCAGNAAAAATCCAAAAATACANNTTCTGGNANTTTTGTNTTGNANA
CCCTCANNAAAAATGNGGGNAAAGNGNWTTCANCAAATAATCNAGNGGNATATCTTACNTGAA
ANGGTTAANATAGNGAANAANAANCANATTTAAATGNGAGGNAANAATACGTGATTTTAAATTGA
TNCNTGGCAAGAAGNTTTNGGGGGGNCTACNGGGGTTTATCCTCAATATCATGCAGCGNATAATG
AATTGAAGTCTGCTGNANTTNAGTTNCCACCACNAGATGAGAAATAGNGTACCATTCTTCAC TCCT
CCTCAAACCTCAGCCAATTGTTCAATCTGCTGAAGAAATATGATGATGCTACTATTCAGGCTTCTCT
CCAGTCAGATGCATCTGGCCTTAGTTTGATAGAGATCAAAAATGCTGAAGGACTAGCTGATGTGT
TGATGGAATGCTTAGTGCCTTGAATCC TAAAGACCATGAGGGTGTGAAGGAGGAA GTGATGTGT
GACCTTGTTGACCAGTGCCTCATACCAAAGCGGGT CATGCTTCTTGTAACACTACTACGGA
TGAGGAGCTTTTAGGTAAGGGATTGGCACTGAATGACAGTCTTCAGCGAGTGCTCTGTAGACATG
ATGATATGGTGAAAGGAACTTCTGATTCAGTGCTAGAGAAGCAGAAACTACAGTTCTGCCACTT
GTAAATGTAAACCATGAAGATGATGAATCAGAAGAGGATTTTGTCTCAACTAGCCCATAGGTCATC
ACGTGATTTCTCATGCACAGAATAGGAAACCAGTCTATGACAAGGCAGAACCAGGGAGGATAAACC
CAGTTATTCACCCACCGCCAGCATCAAAGAAGCCTGCTACTCTGGCAC TGGTGTGGTTGACTAT
CTCAGCGGTGATACATACAAGACAGAAGGATCTCCTCAAACTCAGAACGCACTTCATTGTCAGC
TCCTGTCCATTCTAGCCCTAATCCAACCTCATCAGTGTCTTCATCTCGTCCCATGCCGTGAGTA
CCTCAGCACCTATTTTAGCAGCAGCCTGTGTATGATGAACAGCCATCTTCTGAGAGGCTGCCT
CAAGCTCCCTTGATACCCAATCTTCTGGCATCATTCCACCCCCACCTTCAAAGTATAATCAGAG
ACAACAGTTTTTTGAGCAACAAGGTGCATCCATTCAAGTAGTGGATCCAATTCCTCTTATGACA
GCTTGGTGGGACAACTCAAATCTCTGCTGAATTCATCCACCCCAACCAAAGAACAGAAGCCA
GAAGATGCCCTTTCAAAGATCTTGTGATTTTGCGAAATCAAACCTCATCATCTTCAAACC
CAATAATAGGTCATATGGA tatatTTgtgTTtgccttTgtctTgtgctggtaCgggttatgaatgtt
ttatcttgtttttttccagatcaatgagagcgacctgtttgtggttTgtttaggaccttcgg
atatgaattgatcatgctgttatTTTtacatataTTTgcttatattcatgtataTTgttcaattga
atTTgttggcttatgttttcaataaatacagattcttttaagcatc
    
```

Figura 3.19. Secuencia nucleotídica de *PvGGA1* extendida por RACE 5´. La porción sombreada corresponde a la secuencia extendida por RACE 5´. En mayúsculas se detalla el ORF completo de 1518 bp, mientras que las regiones UTR se indican en minúsculas. Las secuencias subrayadas corresponden a la posición de los cebadores específicos diseñados en base a la secuencia inicial de 1295 bp de *PvGGA1*. El codón de inicio y fin de la traducción están sombreados con negro.

El análisis de la secuencia obtenida en el RACE 5' por BLAST reveló que se trataba efectivamente de un cDNA cuya secuencia mostraba 100% de homología con *PvGGA1* en la región en que se solapaban, y cuyo 5' codificaba para el dominio VHS. Se ensambló la secuencia obtenida con la de *PvGGA1*, extendiéndose 445 bp hasta el codón de inicio de la transcripción más 191 bp correspondientes a la región 5' UTR. El marco abierto de lectura completo obtenido fue de 1518 bp. La secuencia completa se muestra en la **Figura 3.19**.

Ensayos de sobreexpresión de *PvGGA1*: se realizaron ensayos con plantas transformadas que sobreexpresan *PvGGA1* fusionado al péptido FLAG bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV). La secuencia codificante completa obtenida mediante RACE 5' como se describe en el apartado anterior de *PvGGA1* se amplificó por PCR como se describe en Materiales y Métodos y se clonó para obtener la construcción p35S:*PvGGA1*. Como control se utilizó una construcción similar que expresa los genes reporteros GFP y GUS (p35S:GFP GUS). Este control está dirigido a examinar el efecto intrínseco de la sobreexpresión a partir de un promotor fuerte como el 35S en plantas más allá de un gen específico, ya que tanto el *gus* como *gfp* no tienen un rol en la nodulación. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que no existen diferencias en la nodulación entre plantas transformadas con p35S:GFP GUS o con el plásmido vacío p35S:HF, que sólo expresa el péptido FLAG (Zanetti *et al.*, 2010, en prensa).

Se escogieron cuatro plantas por cada tratamiento, y se cuantificó por *qRT-PCR* el nivel de transcritos de *PvGGA1* (**Figura 3.20**). Los niveles de sobreexpresión en las plantas fueron variables. En las raíces en las cuales se detectó la mayor acumulación de transcritos, ésta fue 5 veces superior al alcanzado en las plantas control.

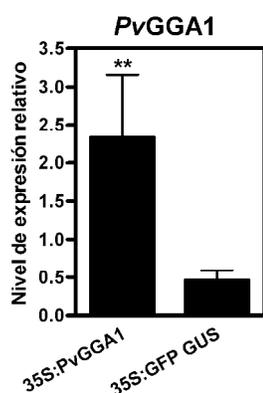


Figura 3.20. Sobreexpresión de *PvGGA1* en plantas compuestas. Se cosecharon las raíces de plantas 35S:*PvGGA1* y 35S:GFP GUS, y los niveles de transcritos de *PvGGA1* se cuantificaron mediante *qRT-PCR*. Los valores obtenidos se normalizaron por los valores de expresión de *EF-1α*. La media \pm SD representa 4 réplicas biológicas. Los asteriscos encima de la columna indican diferencias altamente significativas (*t-test*, $0.001 < P < 0.01$).

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de *PvGGA1* en la formación de nódulos, se examinaron las raíces de plantas transformadas inoculadas con SC15 ó 55N1. Las plantas

35S:*PvGGA1* inoculadas con 55N1 formaron nódulos comparables en cantidad y tiempo de aparición a lo observado en la cinética del control 35S:GFP GUS ($8,89 \pm 2,54$ y $9,07 \pm 2,66$, respectivamente, a los 11 dpi). En cambio, se observó una diferencia de casi 4 veces en el número de nódulos formados en las raíces infectadas con la cepa SC15 en plantas 35S:*PvGGA1* comparado con las raíces control ($39,45 \pm 10,45$ versus $10,55 \pm 3,57$, a los 11 dpi) (**Figura 3.21**). La diferencia fue claramente notoria a los 5 días, indicando que la desregulación del proceso de formación de nódulos se produjo a tiempos muy tempranos.

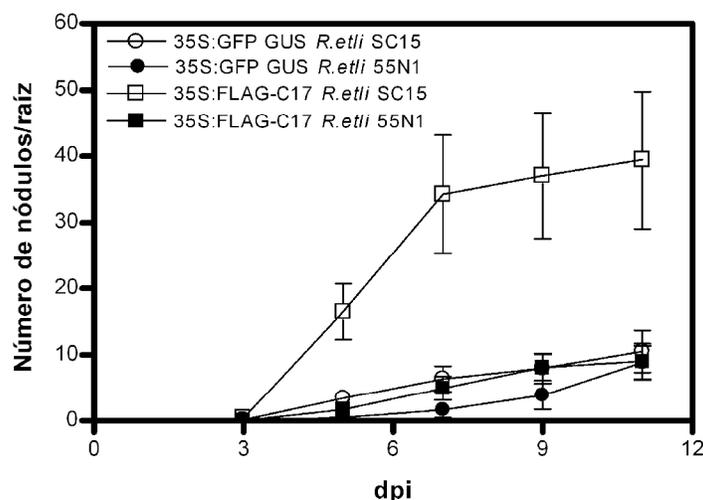


Figura 3.21. Patrón de nodulación temporal de plantas que sobreexpresan GFP GUS y *PvGGA1*. Las plantas se transformaron con *A. rhizogenes* portando el plásmido indicado. Las hairy roots formadas se inocularon con *R. etli* SC15 ó 55N1 y los nódulos se contaron a distintos tiempos luego de la inoculación. Cada valor representa el número de nódulos por raíz \pm SD. n= número de plantas analizadas. Los valores pueden encontrarse en la tabla suplementaria 3.2.

La cuantificación de los nódulos continuó hasta los 12 días post-inoculación. Las plantas que no se inocularon no formaron nódulos, mostrando que no hubo contaminación con otros rizobios presentes en el laboratorio. Luego de más de un mes en las cajas con agar-Fahraeus sin nitrógeno, las plantas transformadas con la construcción p35S:GFP GUS presentaron un aspecto marcadamente clorótico hasta llegar a la senescencia (**Figura 3.22, A**). Por el contrario, las plantas transformadas con la construcción 35S:*PvGGA1* crecidas en las mismas condiciones se mantuvieron verdes, sin los síntomas de marchitamiento observadas en los controles (**Figura 3.22, B**). Estas observaciones se realizaron en cinco plantas independientes por construcción.

Los resultados obtenidos en la cinética con plantas *GGA1* RNAi sugieren que el producto del gen *PvGGA1* es importante para que *P. vulgaris* responda más eficientemente a la inoculación con la cepa hacia la cual presenta mayor afinidad. Por otra parte, un aumento en

los niveles de expresión de los transcritos de *PvGGA1* provocó un incremento muy marcado en el número de nódulos en las raíces infectadas con la cepa SC15. Sin embargo, no hubo alteraciones con respecto a las plantas control inoculadas con 55N1. Estos resultados indican que *PvGGA1* podría ser parte de un mecanismo molecular inducido por la bacteria más afín en plantas mesoamericanas, determinando la eficiencia de la formación de nódulos en la interacción. Por otro lado, el producto de este gen también podría estar involucrado en la muerte celular asociada a la senescencia, ya que las plantas 35S:*PvGGA1* fueron capaces de sobrevivir en condiciones limitantes de nitrógeno.

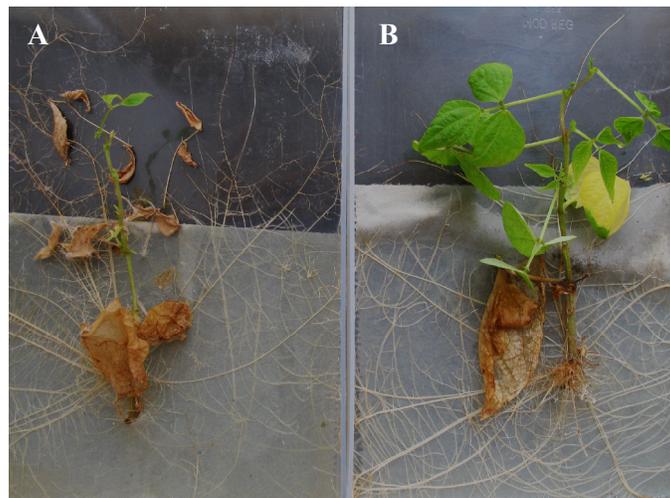


Figura 3.22. Efecto de la sobreexpresión de *PvGGA1* en la senescencia de las plantas en condiciones limitantes de nitrógeno. Ambas imágenes son representativas del aspecto general observado en plantas compuestas 35S:GFP GUS (A) y 35S: *PvGGA1* (B). Las plantas se incubaron 40 días luego del pasaje a cajas con agar Fahraeus en ausencia de nitrógeno y sin inocular.

☑ Localización subcelular de *PvGGA1*

Estudios sobre la localización subcelular de proteínas GGA han mostrado que el dominio GGA es suficiente para producir el reclutamiento a membranas *in vitro*, mostrando una localización semejante a la proteína completa (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2003), mientras que las fusiones del dominio VHS a GFP se localizan en el citosol. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se construyó una fusión traduccional del dominio GAT de *PvGGA1* con la proteína fluorescente verde GFP en el extremo C terminal. El plásmido recombinante obtenido se usó para transformar *A. rhizogenes* K559.

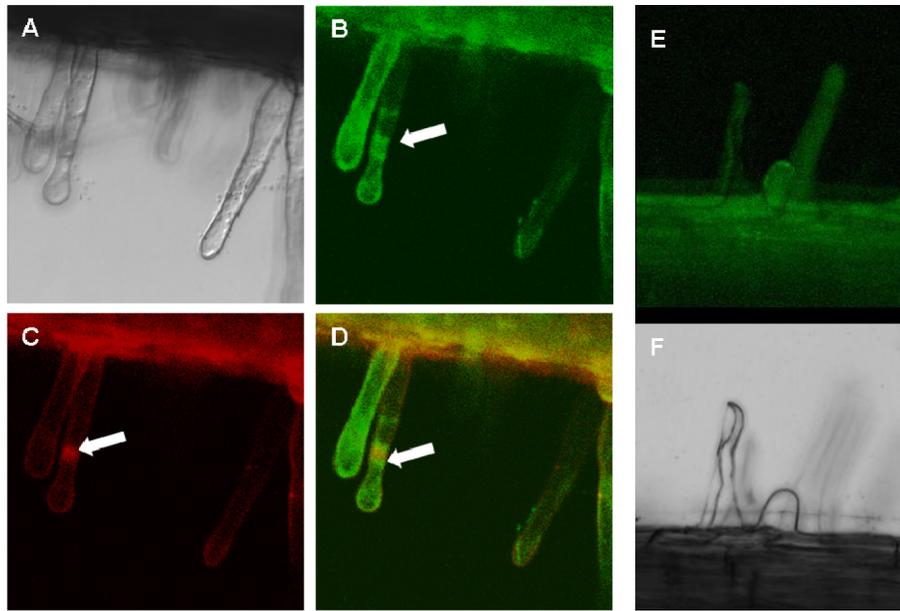


Figura 3.23. Imágenes de microscopía confocal de raíces transgénicas que expresan la fusión traduccional PvGGA1-GFP (A-D) y raíces transformadas con la construcción control, pMDC43 sin inserto (E-F). Se observaron pelos radicales de raíces inoculadas. (A) Luz visible. (B) Luz UV con filtro para GFP (la máxima absorción de GFP es a 457 nm y el pico de emisión está a 504 nm), (C) Luz UV con filtro para luz roja donde se visualiza la tinción con ioduro de propidio (D) Superposición de B y C. Con flechas se indica la posición del núcleo según lo visualizado en el panel C. En este mismo pelo se ve claramente el *swelling* (redondeado o hinchazón) que se forma en respuesta a la presencia del rizobio. Las imágenes son representativas de tres observaciones correspondientes a 3 muestras biológicas por tratamiento.

La señal de fluorescencia verde es visible en la zona circundante al núcleo (**Figura 3.23, B y D**) según la posición estimada mediante la tinción con ioduro de propidio (**Figura 3.23, C**), colorante que se intercala en el ADN luego de un período de incubación prolongado con las células de las plantas. La localización de PvGGA1 en la región perinuclear fue preferentemente visualizada en pelos radicales que presentan la hinchazón de la punta del pelo como respuesta temprana a la presencia de rizobios (ver **figura 3.23, A-D**). El resultado sugiere que la localización subcelular de PvGGA1 puede estar determinada por el proceso de infección por parte de la bacteria, produciendo una translocación a la región del retículo endoplásmico, aunque se requieren más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Proteínas que interactúan con el producto del gen PvGGA1 en el sistema de doble híbrido de levadura

La función de las proteínas GGA en el transporte de vesículas vinculadas con el Golgi permite predecir que estas formarán complejos multiproteicos con otros componentes asociados a las distintas etapas de formación, transporte y fusión de vesículas de exocitosis. Con el propósito

de identificar proteínas que interaccionan físicamente con PvGGA1 se realizó un *screening* de doble híbrido en levaduras. La secuencia parcial del gen PvGGA1 (1071 bp, el mismo que el empleado en la fusión traduccional a GFP) fue clonada en el vector pGBKT7 (Clontech) en fase con el dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL4 DNA-BD).

El plásmido resultante, pGBKT7-PvGGA1 fue utilizado para transformar levaduras Y187 y AH109. La posible toxicidad de la proteína de fusión en levaduras fue medida a través del crecimiento en cultivos líquidos para ambas cepas. Al cabo de una noche, los cultivos presentaron una Abs₆₀₀ mayor a uno, similar a la observada con los controles con pGBKT7, por lo que se concluyó que PvGGA1 no tiene un efecto tóxico o nocivo sobre las células de levadura que la expresan. Teniendo en cuenta que algunas proteínas pueden contener secuencias de activación de la transcripción y por lo tanto activar los genes reporteros en ausencia de interacción con la proteína de fusión que contiene el dominio activador, se llevó a cabo un ensayo de actividad de autoactivación por parte del *bait*. Se cultivó AH109 [pGBKT7-PvGGA1] en medio SD (definido sintético) que carece de triptófano (marcador de selección de pGBKT7), histidina y uracilo (compuestos que son sintetizados si se expresan los genes reporteros activados por GAL4). Transcurridas dos semanas de incubación, no se observó crecimiento (datos no mostrados), por lo que se verificó que el producto de gen PvGGA1 no produce autoactivación y, por lo tanto, puede ser utilizado para el *screening* de una biblioteca de cDNA.

✓ **Screening de doble híbrido**

Para realizar el *screening* se contaba con una biblioteca de cDNA generada a partir de una mezcla de RNA de raíces de poroto cv. Nag12 inoculadas con *R. etli* SC15 ó 55N1 por 12 ó 24 hs (Flavio Blanco, resultados no publicados) y que fuese utilizada previamente por el Lic. Mauricio Reynoso en su tesis. El cDNA fue recombinado en el plásmido pGADT7-Rec y transformado en la cepa de levadura Y187.

Como control de una interacción positiva se realizó un apareamiento (*mating*) entre levaduras Y187 [pGBKT7-53] (que codifica la proteína de fusión entre el dominio de unión a DNA de Gal4, GAL4-DNA-BD, y p53) y AH109 [pGADT7Rec-T] (que codifica la proteína de fusión entre el antígeno T de SV40 y el dominio de activación transcripcional de Gal4, GAL4-AD). También se realizó un control negativo de interacción entre AH109 [pGADT7Rec-T] e Y187 [pGBKT7-Lam] (codifica para la proteína de fusión entre GAL4 DNA-BD y lamina C humana). Al cabo de una semana de incubación de los diploides, se verificó la aparición de

colonias de levaduras en el control positivo, mientras que en la placa del control negativo no se observó crecimiento alguno.

✓ **Cálculo de levaduras viables y eficiencia de *mating***

Para cuantificar el número de células viables luego de 24 hs de *mating* entre AH109 y Y187, se sembraron alícuotas conteniendo diluciones seriales en los medios SD/-Leu, SD/-Trp y SD/-Leu/-Trp. En el primer medio se seleccionan las levaduras que contienen el plásmido pGADT7, en el segundo aquellas que contienen pGBKT7 y en el último los diploides con ambos plásmidos, producto del *mating*. La cantidad de bacterias en cada medio mostró que la cepa Y187 fue la limitante (**Tabla 3.2**). Si se tienen en cuenta el número de colonias crecidas en las diluciones 1:10 (304 colonias) y 1:100 (42 colonias) en el medio SD/-Leu/-Trp, el número de clones analizados osciló en 3 y $4,2 \times 10^6$, que se encuentra dentro de los valores esperados según las instrucciones de la compañía proveedora del kit.

Dilución	Medio SD/-Trp	Medio SD/-Leu	Medio SD/-Leu-Trp
1:10	SC*	SC*	304
1:100	SC*	SC*	42
1:1000	500-600	400	3
1:10000	260	101	2

Tabla 3.2. Número de unidades formadoras de colonias (ufc) crecidas en 0,1 ml de diluciones seriadas del *mating*. SC*: crecimiento confluyente.

Las células restantes provenientes del *screening* de la biblioteca fueron sembradas en placas con medio SD/-Leu/-Trp/-His (TDO, *triple dropout*) para la selección de interacciones. Para evitar el crecimiento de falsos positivos, se suplementaron las placas con 3 aminotriazol (3-AT), para disminuir los escapes a la auxotrofia en histidina por expresión basal. Previamente se había determinado que 10 mM es la concentración mínima suficiente capaz de inhibir el crecimiento de controles negativos.

Luego de aproximadamente una semana de incubación a 30° C en TDO se obtuvieron 5 colonias, las que fueron transferidas a placas de SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade (QDO) para testear la expresión del gen de selección Ade2 que permite el crecimiento en medios sin adenina. De esta forma puede reducirse el número de falsos positivos obtenidos durante el *screening*. Al cabo de 4 días, se observó crecimiento de sólo 3 de las 5 colonias obtenidas originalmente. La presencia de inserto en estos 3 clones positivos fue verificada por PCR utilizando cebadores específicos del vector pGADT7-Rec (**Figura 3.24**).

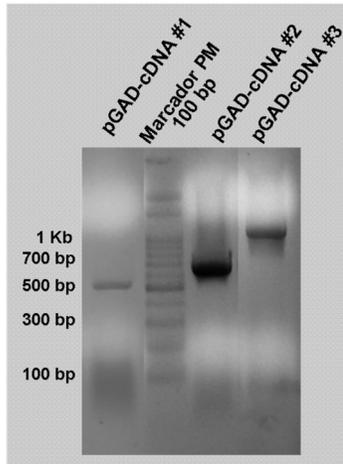


Figura 3.24. Amplificación por PCR con *primers* del vector pGADT7-Rec sobre los 3 clones de levadura positivos para la interacción con PvGGA1. Calle 1: producto de PCR de aproximadamente 500 bp correspondiente al inserto de pGAD-cDNA1. Calle 2: Marcador de Peso Molecular 100 bp (PBL). Calle 3: producto de PCR de 650 bp aproximadamente correspondiente al inserto de pGADT7-cDNA2. Calle 4: Producto de PCR de 1100 bp aproximadamente correspondiente al inserto de pGADT7-cDNA3

A partir de cada uno de estos clones se realizaron minipreparaciones de DNA, cuyo producto fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli*. Las bacterias transformadas con los plásmidos pGADT7-cDNA (1-3) se seleccionaron con ampicilina. Se aislaron los plásmidos de estos tres clones a partir de la bacteria y se secuenció el cDNA con el *primer* 5'AD LD pGADT7-Rec. Posteriormente, para confirmar la interacción, se cotransformó cada uno de estos plásmidos con el *bait* (pGBKT7-PvGGA1) en la cepa AH109. En la **Figura 3.25** se observa que las 3 interacciones fueron confirmadas por el crecimiento de las levaduras en el medio de selección.

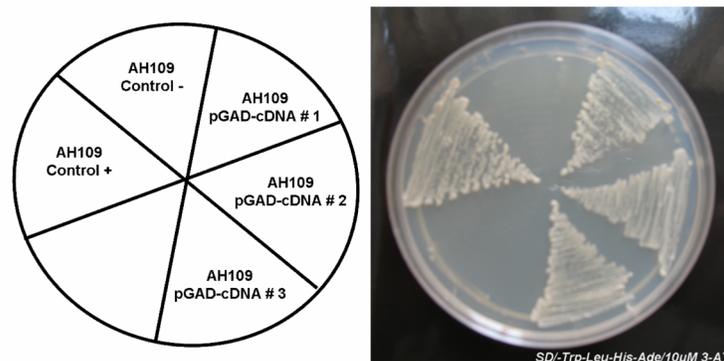


Figura 3.25. Interacciones entre proteínas identificadas en el sistema de doble híbrido de levaduras. **Control +:** levadura AH109 transformada con el antígeno T del virus SV40 y proteína p53, **Control-:** levadura AH109 transformada con el antígeno T y lamina C; **pGADcDNA#1 a 3:** levaduras AH109 cotransformadas con los vectores pGBKT7-17 y pGADT7-cDNA1, pGADT7-cDNA2 ó pGADT7-cDNA3. Las levaduras fueron sembradas en placas con medio QDO suplementado con 3-AT.

✓ **Análisis *in silico* de las secuencias de proteínas que interaccionan con PvGGA1**

La secuencia del inserto presente en los plásmidos aislados de los tres clones positivos se analizó, primero, para eliminar la secuencia perteneciente al vector, y segundo, para verificar

la presencia de un marco abierto de lectura fusionado a la secuencia del dominio de activación de GAL4. De este modo se obtuvieron secuencias de poroto de 177, 423 y 386 bp contenidas en los vectores PGADT7-cDNA 1-3, respectivamente. Luego se compararon con la base de datos de transcritos, ESTs (Expressed Sequence Tags), GSS (*Genome Survey Sequences*), STS (*Sequence Tagged Sites*) y HTG (*High-throughput genomic*) de *P. vulgaris* a través del sitio del PlantGDB (*Plant Genome Database*).

La secuencia del cDNA1 #1 presentó máxima homología a un transcrito de 323 bp de *P. vulgaris* cv Early gallatin (gi1716384476) con un valor E: $1e^{-89}$. La segunda secuencia, del cDNA #2 (423 p), presentó homología a una secuencia de 755 bp de *P. vulgaris* con un E: $1e^{-137}$. Finalmente, el cDNA #3 presentó homología a una secuencia de 616 bp de *P. vulgaris* con un E: 0. Este análisis permitió, no sólo extender la secuencia del cDNA de las posibles proteínas interactoras, sino también confirmar la presencia de un inserto correspondiente a una secuencia de poroto. La nomenclatura usada subsiguientemente para estas tres posibles proteínas interactoras fue: GIP #1, #2 y #3 (por *GGAI Interacting Protein*). La superposición de las secuencias con aquellas identificadas en la base de datos de *Phaseolus* produjo 3 TCs de 323, 755 o 616 bp, las cuales fueron comparadas con la base de datos nr a través del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando BlastX (Altschul *et al.*, 1997). El resultado de éste análisis se resume en la **Tabla 3.3**.

	Especie	Anotación en la base de datos	Valor E
GIP#1	<i>Glycine max</i>	unknown	8e-110
	<i>Vitis vinifera</i>	unnamed protein product	2e-77
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BI1-like protein	5e-77
	<i>Zea mays</i>	transmembrane BI motif-containing	4e-69
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	5e-77
GIP#2	<i>Vitis vinifera</i>	hypothetical protein	6e-62
	<i>Nicotiana</i>	hypothetical protein	2e-61
	<i>Populus trichocarpa</i>	predicted protein	2e-61
	<i>Medicago truncatula</i>	unknown	4e-60
	<i>Capsicum chinese</i>	C2 domain-containing protein	2e-58
GIP#3	<i>Medicago truncatula</i>	unknown	1e-50
	<i>Lilium longiflorum</i>	cytochrome P450-like TBP protein	2e-44
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	hypothetical protein	8e-44
	<i>Picea abies</i>	senescence-associated protein	5e-43
	<i>Nicotiana tabacum</i>	cytochrome P450 like TBP	6e-29

Tabla 3.3. Homología de secuencia de las proteínas que interaccionan con PvGGA1 en el sistema de doble híbrido de levaduras. Se muestra el listado de proteínas con mayor similitud presentes en otras plantas, leguminosas y no leguminosas, obtenidas de comparar las secuencias de los tres clones contra la base de datos no redundante (nr) utilizando BlastX.

relación con la especificidad de la interacción. Se verificó una mayor acumulación de los transcritos de estos genes en plantas Nag12 inoculadas con la cepa SC15, comparada con los niveles alcanzados en plantas inoculadas con 55N1. En Alubia, en cambio, con la excepción de *PvRHS24-43*, el cual no presentó diferencias con el control sin inocular, los genes en estudio presentaron un nivel de transcritos mayor en las plantas inoculadas, pero que no difirió significativamente entre las cepas empleadas.

Uno de estos clones, el cóntigo *PvRHS24-25*, codifica para una inmunofilina, enzima cuyo rol en la simbiosis aun no ha sido claramente establecido. Debido a que funcionan como chaperonas moleculares mediando la isomerización *cis-trans* de las uniones peptidil-prolina, podrían prevenir el riesgo de agregación y degradación proteolítica de polipéptidos parcialmente plegados. El programa genético de nodulación implica la síntesis *de novo* de diversas proteínas (nodulinas, tempranas y tardías). En lupino se reportó el aislamiento y caracterización de un gen que codifica para una ciclofilina que se acumula en el meristema del nódulo y en zonas de diferenciación cuando es inoculada con la bacteria simbiótica *Bradyrhizobium sp.* (Nuc *et al.*, 2001), donde las ciclofilinas serían necesarias, mediante su actividad PPIasa, para el correcto plegado de nodulinas requeridas para la morfogénesis del nódulo, las PRPs (*proline rich proteins*), las PTGRP (*Pro-, Thr-, and Gly-rich proteins*) y las HRGP (*hydroxyproline-rich glycoproteins*). Solamente las proteínas que se han plegado correctamente serán funcionales y podrán ser transportadas al destino subcelular donde cumplen un rol biológico. La proteína codificada por *PvRHS24-25*, que se induce específicamente en plantas inoculadas con la cepa SC15, podría desempeñar funciones similares al de la inmunofilina estudiada en lupino, aunque en nódulos determinados. Un estudio más profundo de este gen mediante estudios de genética reversa ayudará a comprender el mecanismo por el cual una inmunofilina está involucrada en la interacción de poroto con cepas más eficientes.

Otro gen analizado, *PvRHS24-26*, codifica para un inhibidor de proteasas de tipo Kunitz. Este tipo de proteínas podrían funcionar como un mecanismo de defensa preformado o inducible, regulando la actividad de proteasas, tanto de origen vegetal como de la bacteria. Los inhibidores se unen a las proteasas formando complejos estables, similares a las asociaciones sustrato-enzima, bloqueando el sitio activo de las proteasas, de forma de controlar la degradación de componentes celulares y evitar la desorganización de la célula (Richardson, 1991). En la leguminosa *S. rostrata* también se ha identificado un gen, denominado *SrP11*, perteneciente a la familia Kunitz de inhibidores de proteasa, cuyo

transcripto se acumula tempranamente luego de la inoculación con rizobios, pero no frente a estímulos tales como heridas o ataque de patógenos. El patrón de expresión de este gen en *Sesbania* es muy similar al de otras dos nodulinas identificadas, una quitinasa y una chalcona reductasa (Mathesius, 1998). Mediante estudios de hibridación *in situ* el transcripto se detectó en la zona del nódulo que rodea a las células infectadas por los rizobios. Lievens *et al.*, (2004) han propuesto que *SrP11* actuaría como una barrera protectora para evitar el escape de las bacterias contenidas en los nódulos, ya que podrían tener un efecto patogénico en caso de que se diseminen hacia otros tejidos de la planta. En nódulos maduros, que carecen de un meristema activo, la expresión cae pronunciadamente (Lievens *et al.*, 2004). En otro trabajo (Manen *et al.*, 1994) se identificó también un inhibidor de proteasa tipo Kunitz, que se induce durante la senescencia de las células infectadas, y que controlaría la actividad de proteasas de origen bacteriano o vegetal necesarias para mantener la presencia de la bacteria dentro del simbiosoma. Si bien estos antecedentes sugieren un rol para los inhibidores de proteasas en estadios avanzados, esto es, nódulos funcionales o senescentes, no es tan directo establecer cuál sería el rol de *PvRHS24-26* durante las etapas tempranas de la interacción a nivel de reconocimiento cepa específico.

La proteína codificada por *PvRHS24-43*, que participa en la vía de síntesis de JA, también podría formar parte de los determinantes moleculares que hacen al reconocimiento específico de cepa. La función más documentada del JA, producto final de la vía biosintética, es la de promover la inducción de la expresión de genes de defensa por heridas y ataque de patógenos (Balbi & Devoto, 2007), tales como aquellos que codifican para las enzimas fenilalanina amonioliasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), necesarias para la síntesis de fitoalexinas (Wasternack *et al.*, 2006). Estos compuestos forman parte de la respuesta inducida frente a la infección por patógenos (Madriz Ordeñana, 2002). Sumado a su participación en respuestas de defensa, el JA, en sinergismo con los flavonoides, es capaz de inducir los genes *nod* en *B. japonicum* y *Rhizobium* (Mabood *et al.*, 2006). Promueve, aparte, el desarrollo de la raíz (Wasternack *et al.*, 2007), como la formación y densidad de pelos radicales en *Arabidopsis* (Zhu *et al.*, 2006), lo que sugiere un rol de esta hormona en la formación de órganos de origen epidérmico. Sin embargo, es un regulador negativo de la nodulación en *M. truncatula* (Sun *et al.*, 2006) y en *L. japonicus* (Nakagawa & Kawaguchi, 2006), disparando señales de defensa en la planta frente al rizobio, similares a la respuesta que se induce en respuesta a un patógeno. Como los jasmonatos son las principales señales implicadas tras una herida, es posible que durante el proceso de infección por rizobios se formen ácidos grasos precursores

de la vía de los octadecanoides por ruptura de la membrana lipídica, resultando en un aumento de la síntesis de jasmonatos. Se podría especular que determinadas combinaciones de jasmonatos y flavonoides provocarían la síntesis de una población de NF que resultan más efectivos para la nodulación de una leguminosa en particular, y esto podría contribuir a la especificidad simbiote -hospedador.

Rol de PvGGA1 en la simbiosis

La secuencia del clon PvRHS24-17 presentó homología a las proteínas denominadas GGA, que están asociadas al tráfico de proteínas en vesículas entre distintos compartimentos celulares. Además, en la lista de los 41 cóntigos identificados en la hibridación sustractiva, se identificaron otros dos genes que participarían del mismo proceso celular: PvRHS24-14, una ARF-GAP, que participaría en la regulación de la actividad de las proteínas G monoméricas de la familia Arf, y PvRHS24-03, o PvRabA2a, que codifica para una proteína G monomérica de la familia Rab (Peltzer Meschini *et al.*, 2008). El silenciamiento de este último gen ha mostrado evidencia genética de la relación entre la nodulación y el tráfico vesicular desde el Golgi, abriendo una nueva línea de estudio dentro del campo de las relaciones entre leguminosas y rizobios (Blanco *et al.*, 2009).

Las GGA han sido identificadas en varios organismos, desde levaduras hasta plantas. Sin embargo, la mayor parte del conocimiento que se tiene de este tipo de proteínas procede de estudios llevados a cabo en células de mamíferos y levaduras (Bonifacio, 2000). En plantas se han identificado proteínas con los dominios VHS y GAT, sin embargo la conservación de secuencia comparada con las GGA de mamíferos es baja, por lo que se pone en duda si son realmente GGA, o cumplen funciones análogas en plantas. La función más caracterizada de las GGA es de adaptadores entre las proteínas transportadas en las vesículas del TGN hacia otras organelas (**Figura 3.29**).

Para ubicar espacial y temporalmente a las GGA en el funcionamiento de las células, primero resulta adecuado hacer una breve síntesis del proceso de síntesis de las proteínas. Esta se lleva a cabo en el RE, desde donde son transportadas hacia el TGN (conocido también como “*sorting center*”, Gu *et al.*, 2001), mediante el aparato de Golgi. Tanto en células animales como vegetales, un *stack* de Golgi está constituido por las cisternas aplanadas (zona media) con una zona o cara de entrada (*cis*) y otra de salida (*trans*). Esta polaridad morfológica del aparato de Golgi se traduce en una polaridad funcional y un tráfico vectorial en sentido de la

ruta secretora hacia la membrana plasmática. Las vesículas de transporte que viajan desde el ER hasta el aparato de Golgi presentan una serie de cubiertas (*coats*) formadas por complejos multiproteicos que al autoensamblarse deforman la membrana donadora para formar las vesículas de transporte. Estas vesículas están decoradas por proteínas de cubierta específicas, que determinan las proteínas a ser transportadas. Hasta el momento se han descrito tres proteínas que forman la cubierta de las vesículas: COP-I, COP-II y clatrina (Kreis & Pepperkok, 1994; Scales *et al.*, 2000). La clatrina está constituida por la asociación de tres cadenas pesadas y tres ligeras que se ensamblan formando figuras poliédricas a modo de red de canasta de baloncesto. Originariamente se descubrieron en relación con la endocitosis mediada por receptor y posteriormente se han visto también en los procesos de salida de las proteínas del aparato de Golgi destinadas a los lisosomas (Le Borgue & Hoflack, 1998). Hay que tener en cuenta que la formación de vesículas es un proceso que está altamente regulado por otras moléculas, muchas de las cuales están directamente implicadas también en procesos de señalización intracelular (Stow, 1995; De Camilli *et al.*, 1996). Esto es importante porque permite a la célula regular su tráfico intracelular en función de lo que acontece en un momento determinado del exterior.

Tanto las proteínas solubles como las de membrana que van a seguir la ruta secretora, deben salir del RE camino al aparato de Golgi para sufrir las modificaciones postraduccionales requeridas para su maduración (como por ejemplo, la glicosilación y la fosforilación), plegadas y finalmente enviadas a sus respectivos destinos. Los componentes de la pared celular también son transportados mediante vesículas secretorias en el TGN (Lerouxel *et al.*, 2006).

Es en este punto que aparecen las GGA, que facilitan el transporte de proteínas en vesículas, gracias a distintos motivos que les permiten interactuar simultáneamente con clatrina, Arfs, y otras proteínas accesorias. En la imagen de la **Figura 3.29** se representa las interacciones de los distintos motivos presentes en las GGA con otras proteínas. Las vesículas se escinden de la membrana donante, se transportan asociadas al citoesqueleto y luego se fusionan a la membrana de la organela receptora, en donde liberan proteínas solubles y de membrana (conocidas genéricamente como "*cargo*").

Las CCV (*clathrin coated vesicles*) contienen clatrina y proteínas adaptadoras heterotriméricas (*adaptor proteins*, APs), que conectan el *cargo* con la clatrina en los sitios de "*budding*", o brote de las vesículas (Robinson & Bonifacino, 2001). El hallazgo de las GGA ocurrió en principio por la homología que presentaban al dominio carboxilo terminal de la subunidad γ de AP-1 (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000). Ambas proteínas sirven

de adaptadoras de clatrina, sin embargo, las GGA y AP-1 funcionarían en distintos pasos del transporte entre el TGN y el complejo prevacuolar (PVC; *prevacuolar complex*) o facilitarían el transporte de distintas vías entre el TGN y los endosomas (Abazeed & Fuller, 2008). Además, se detectó la interacción de ambas proteínas en células de mamíferos y levaduras (Costaguta *et al.*, 2001; Doray *et al.*, 2002). Mientras que las AP son multímeros, las GGA que funcionan como monómeros, tendrían incorporada las distintas funciones atribuidas a las diferentes subunidades de las AP en una única cadena polipeptídica. La localización perinuclear de PvGGA1 observada mediante fusiones traduccionales a GFP es consistente con la función atribuida a este tipo de proteínas, ya que el RE y el complejo de Golgi se localizan en la zona alrededor del núcleo.

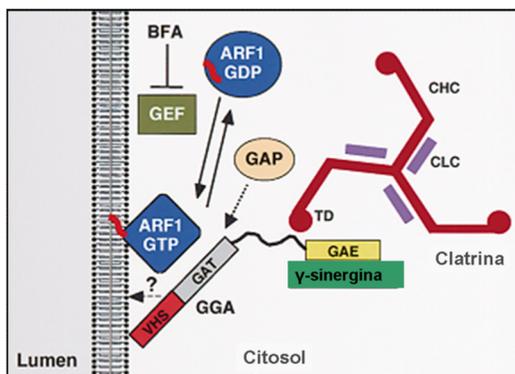


Figura 3.29. Modelo de interacción de las GGAs con otras proteínas. Cada uno de los dominios interactuaría con una o más proteínas, en la membrana del TGN (*trans Golgi network*), facilitando la distribución de proteínas cargo y formación de vesículas en un proceso regulado por la actividad de las GTPasas monoméricas de tipo ARF. La unión del dominio GAT a las ARFs interferiría con la actividad de la proteína GAP (GTPase Activating Protein), lo que provoca la estabilización transiente en la membrana del Golgi de este complejo. GEF (GTP Exchange Factor) y GAP son dos proteínas accesorias que controlan el estado activo de las GTPasas monoméricas. El dominio VHS puede unirse a otras proteínas o fosfolípidos de membrana. El dominio GAE puede unirse a γ -sinergina u otras proteínas citosólicas. **CHC**: cadena pesada de clatrina; **CLC**: cadena liviana de clatrina, **TD**: dominio terminal. **BFA**: brefeldina A, **Arf**: ADP-ribosilation factor. Adaptado de Puertollano *et al.* 2001.

Una vez en el TGN, la vía que toman las proteínas depende principalmente de los motivos presentes en las mismas y de GTPasas asociadas a las vesículas (Ni *et al.*, 2006; Piper & Luzio, 2007). Esta compartimentación estructural y funcional viene determinada por la composición diferencial de los componentes de las membranas. El conocimiento de las señales que guían y/o controlan la localización de proteínas y cómo se transportan a los distintos compartimentos u orgánulos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas, cloroplastos, mitocondria, peroxisomas, entre otros) resulta esencial para comprender el mecanismo mediante el cual el tráfico vesicular está modulado en la interacción simbiótica.

El tráfico de proteínas en las plantas se modifica en respuesta a la infección con patógenos (Hardham *et al.*, 2008), ya que es necesario una adecuada distribución espacio temporal de proteínas a varias organelas (Geldner, 2004; Surpin & Raikhel, 2004; Leshem *et al.*, 2006; Robatzek, 2007). Dado que la infección de las células vegetales por los rizobios presenta muchas similitudes al de infección por microorganismos patógenos, es posible especular que las GGA modulen el patrón de distribución de proteínas y componentes de pared celular, específicos y necesarios para el establecimiento de la simbiosis.

Además, en los pelos radicales en desarrollo en contacto con rizobios compatibles ocurren cambios notables en la arquitectura, como el redireccionamiento del crecimiento. Este crecimiento tiene lugar en la punta principalmente, en el que es importante la exocitosis altamente polarizada de vesículas del Golgi, cuyo contenido se integra a la pared celular.

El estudio de los perfiles de expresión se ha convertido en una importante herramienta para investigar cómo un organismo responde, en el nivel molecular, a cambios ambientales. Las plantas, como organismos sensibles a múltiples estímulos, tienen la capacidad de adaptar su transcriptoma como forma de respuesta. En particular, nos interesamos en estudiar el perfil transcripcional de *PvGGA1*. Encontramos que los niveles estacionarios de mRNA de *PvGGA1* son notablemente superiores en raíces y tallo que en el resto de los órganos evaluados. Su inducción depende de la presencia no sólo del NF, sino también de componentes extracelulares de los rizobios. Por otro lado, prácticamente no se observaron cambios significativos en la acumulación de transcritos de *PvGGA1* cuando se aplicaron hormonas a las raíces. Es importante destacar que las hormonas no participan de forma aislada en la activación de los procesos que regulan, sino que lo hacen interaccionando con otras moléculas señalizadoras. Por ejemplo, se ha descrito un amplio número de interacciones entre el JA y otras rutas de señalización hormonal como las de etileno, SA, auxinas o ABA (Turner *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003). La respuesta a cada uno de estos estímulos está determinada en parte por la interacción, positiva o negativa, que se establece entre las rutas de señalización. Por otra parte, el agregado exógeno de hormonas puede no ser representativo de las condiciones fisiológicas del proceso de nodulación, donde son importantes los cambios locales de las relaciones entre auxinas y citoquininas, dando como resultado la activación de la división celular en las células del córtex para iniciar la organogénesis del nódulo (Oldroyd & Downie, 2008). Sólo se detectó un leve incremento de los niveles de transcritos de *PvGGA1* en respuesta al tratamiento con citoquininas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos del análisis *in silico* del patrón de expresión del gen más homólogo a *PvGGA1* en la leguminosa modelo, *M. truncatula*, con lo que podría especularse que cumplen funciones homólogas en ambas leguminosas.

Además, la acumulación de transcritos fue superior en raíces infectadas con cepas de *R. etli* representativas de los alelos *nodC- α* en comparación con cepas *nodC- δ* . Estos resultados mostraron que no se trata de un fenómeno aislado y exclusivo de una cepa altamente competitiva como SC15, sino que depende sustancialmente de la naturaleza de las cepas empleadas, ya que en mayor o menor medida, se hace extensivo a otras cepas que resultan igual de eficientes y competitivas en simbiosis con la variedad mesoamericana Nag12 y que

se encuentran predominantemente en la misma región geográfica en que se produjo la diversificación genética del pool génico mesoamericano.

La caracterización funcional de *PvGGA1* fue abordada haciendo uso de genética reversa, a través del sistema de transformación mediada por *A. rhizogenes*. Esta técnica, descrita por otros investigadores (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), fue puesta a punto en nuestro laboratorio, lo que nos permitió obtener plantas de poroto compuestas, con una parte aérea salvaje y una raíz transgénica. Este método, que comenzó a usarse de rutina desde hace aproximadamente tres años, posee la ventaja de que el proceso experimental completo, desde la germinación de la semilla hasta la obtención de la planta compuesta, demora entre 4 y 5 semanas. El uso de la cepa de *A. rhizogenes* K599 transformada con el vector binario p35S:GUSGFP+, que permite la expresión de la proteína GFP bajo el control del promotor constitutivo del virus del coliflor CaM35S, permitió visualizar la raíces transformadas fluorescentes. Del mismo modo, se obtuvieron raíces transgénicas transformadas con el vector pK7GWIWD2. Dichas raíces transgénicas desarrollaron nódulos normales luego de la inoculación con *R. etli*. El estudio de la cinética de nodulación demostró que las raíces transformadas conservan la respuesta diferencial ante las cepas *nodC- α* y δ , requisito necesario para estudiar la función de los genes identificados como diferenciales en dicho proceso.

Se evaluó el efecto de la reducción en los niveles de transcripto de *PvGGA1* en la nodulación de raíces de poroto de los cultivares Nag12 y Alubia. Esto se llevó a cabo mediante la estrategia de RNAi. La estructura intramolecular de doble cadena generada en el RNA es detectada por la maquinaria de silenciamiento, que lleva a cabo el corte del transcripto complementario a los RNA de interferencia de ~21 a ~24 nucleótidos generados (Marx, 2002; Carthew, 2001; Baulcombe, 2004; Hamilton & Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Djikeng *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). El silenciamiento alcanzado en la expresión del gen *PvGGA1* fue parcial, por lo que resulta más adecuado entonces referirse a reducción en los niveles de expresión cuando se hace referencia a plantas transformadas con la construcción de RNAi. Comparadas con plantas transformadas con una construcción control, las raíces *PvGGA1* RNAi presentaron una reducción en el nivel de transcripto cercano al 75%.

La reducción en los niveles de transcripto de *PvGGA1* se tradujo en un fenotipo que dependió de la cepa empleada. Las raíces infectadas con la cepa *nodC- α* SC15 desarrollaron un número de nódulos significativamente menor que el control, mientras que con la cepa 55N1, la reducción en los niveles de transcripto de *PvGGA1* no alteró la formación de nódulos. En

Alubia, en cambio, no se observaron alteraciones en el patrón de nodulación con cada cepa en plantas transformadas con las mismas construcciones de silenciamiento. Estas diferencias en el fenotipo dependiendo del cultivar de poroto, sustentan la hipótesis de que existen determinantes moleculares específicos de nodulación que surgieron como consecuencia de la coevolución en el cultivar de mesoamericano de poroto, por lo que no necesariamente cumplen un rol similar en la formación de nódulos en plantas provenientes de cada uno de los pools génicos.

Considerando que la delección de los dos genes que codifican para GGA en levaduras afectan el procesamiento proteolítico de carboxipeptidasa Y (CPY), proteinasa A, y carboxipeptidasa S, todas hidrolasas que son distribuidas desde el Golgi temprano hacia el complejo prevacuolar en la ruta hacia la vacuola (Black & Pelham, 2000; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Costaguta *et al.*, 2001), se puede especular que la alteración de los niveles de transcripto de *PvGGA1* podría estar afectando el transporte de hidrolasas desde el Golgi hacia el PVC. Esta hipótesis puede ser contrastada experimentalmente midiendo la localización subcelular de las hidrolasas en un background *PvGGA1* RNAi.

Existen evidencias de que la alteración del tráfico de vesículas incide negativamente en la diferenciación de células infectadas y de los bacteroides (Cheon *et al.*, 1993). Además, la secreción ordenada de proteínas es esencial para la formación del simbiosoma en la asociación entre *M. truncatula* y *S. meliloti*. Un mutante de Medicago, *dnf1*, se encuentra arrestado en un estadio intermedio en el desarrollo del nódulo (las bacterias que ingresan a las células de las plantas permanecen pequeñas, sólo alcanzan el estadio I de bacteroide), y presenta un elevado número de cuerpos (pre) autofágicos/autofagosomas, lo que estaría indicando una maduración retrasada de vesículas, o dificultad en la maduración de las vacuolas en *dnf1* (Wang *et al.*, 2010).

Para profundizar sobre el rol de *PvGGA1* en la nodulación, se obtuvieron plantas compuestas con raíces transgénicas que sobreexpresaban dicha proteína bajo el control de un promotor fuerte y con una expresión constitutiva en casi todos los tipos celulares. En bibliografía no hay muchos estudios en lo que se describa el efecto de la sobreexpresión de GGA, menos aún en plantas, ya que la mayoría de las evidencias funcionales que se tienen al respecto proviene de estudios en células de levadura y mamíferos. Además, la función del TGN en los endosomas tempranos en plantas es muy distinto al que desempeña en mamíferos y levaduras (Lam *et al.*, 2007). Por ejemplo, el TGN en plantas funciona como un endosoma temprano, una organela asociada a la endocitosis, ya que un compuesto fluorescente lipofílico, FM4-64, es transportado inmediatamente al TGN luego de internalizado por endocitosis en la

membrana plasmática de plantas, mientras que en animales y levaduras, ambos compartimentos están claramente separados (Lam *et al.*, 2007).

Hay muchas evidencias de que la ubiquitinación de proteínas regula el tráfico de membranas (Hicke, 2001; Bonifacino & Traub, 2003), sugiriendo que las GGA regulan el tráfico de proteínas ubiquitinadas directamente o indirectamente a través de la interacción con proteínas que presentan esta modificación.

La sobreexpresión en células de mamífero de GGA3 (una de las 3 GGA presentes en mamíferos) provocó la acumulación de proteínas ubiquitinadas en el Golgi. Se especula que la unión Ub-GGA esté favorecida por la acción de la proteína ARF-GTP, que recluta las GGA en las membranas donde pueden interactuar con otra proteínas ubiquitinadas para cooperar en el proceso de tráfico vesicular (Shiba, 2004).

El fenotipo en la simbiosis de la sobreexpresión de *PvGGA1*, de la misma forma que las plantas con niveles reducidos de este gen, dependió de la cepa empleada. En su conjunto, estos resultados indican que la alteración de los niveles de expresión de *PvGGA1* afecta el curso normal de la interacción entre *P. vulgaris* y su microsimbionte, *R. etli*. Sin embargo, la relevancia de su participación en la formación del nódulo, y particularmente, en la especificidad de cepa del tipo estudiada, no puede inferirse con completa certeza a partir de los ensayos con plantas compuestas *PvGGA1* RNAi, ya que como se comentó más arriba, el silenciamiento logrado no fue total, por lo que el fenotipo observado muy probablemente esté en parte enmascarado por el efecto de un fondo de expresión residual que afecta la interpretación de los resultados. Lo más apropiado en este sentido es la obtención de mutantes *knock-out*. Una posible estrategia sería la utilización de colecciones de Tilling.

Durante los últimos años se ha establecido el uso del sistema de doble híbrido de levadura como una herramienta de gran utilidad para detectar interacciones entre proteínas. Así por ejemplo se han analizado proteomas completos detectando nuevas interacciones entre proteínas y colaborando de forma significativa a aumentar el conocimiento de las complejas redes de interacción entre proteínas de un organismo completo. La debilidad de esta técnica es que puede dar muchos falsos positivos sobre todo en los ensayos a gran escala, ya que se expresan juntas y a la vez proteínas que en condiciones fisiológicas no tienen por qué coincidir nunca en el espacio (pueden expresarse en compartimentos o tipos celulares distintos) ni en el tiempo (su regulación puede hacer que nunca se expresen a la vez). Las distintas modificaciones postraduccionales (fosforilación, glicosilación, etc.) son otras de las causas de algunos falsos positivos, ya que este tipo de modificaciones puede impedir que ocurran en estado fisiológico interacciones detectadas por el sistema de doble híbrido. De todas formas, constituye un sistema de *screening*

verdaderamente útil, ya que permite identificar en tiempo relativamente corto, potenciales proteínas interactoras en un sistema biológico como el de levadura.

En ensayos de doble híbrido, Shiba *et al.*, (2004), demostraron la unión a Rabaptina 5 (Mattera *et al.*, 2003) y ubiquitina de la porción C terminal del dominio GAT, mientras que la región N terminal es la que interacciona específicamente con las Arfs (Bonifacino *et al.*, 2001). Estos datos indican que el dominio GAT estaría compuesto de dos subdominios con roles completamente distintos, y capacidad de unión a múltiples efectores.

El dominio GAT de *PvGGA1* usado como *bait* en el screening de doble híbrido en levaduras nos permitió identificar tres posibles interactores que resultan buenos candidatos de participar en los procesos celulares que involucran a *PvGGA1*. La proteína GIP#1, como ya se mencionó, contendría un dominio de los *Bax inhibitor*. Su sobreexpresión en plantas provoca un efecto citoprotector (Sánchez *et al.*, 2000; Bolduc *et al.*, 2003; Kawai-Yamada *et al.*, 2004) y regula los niveles de Ca^{2+} dentro del ER (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). El efecto del BI-1 en la dinámica del calcio es responsable en parte de inhibir la activación *downstream* de la vía mitocondrial de muerte celular (Xu *et al.*, 2008). Estos datos, sumados al efecto observado en las plantas de poroto que sobreexpresaban *PvGGA1*, nos permiten asociar dos proteínas involucradas en un mismo proceso, el de retardar la muerte celular. El fenotipo observado en ausencia de nitrógeno podría entonces estar mediado por la regulación de la muerte celular mediada por proteínas proapoptóticas cuyos niveles estarían alterados en plantas que sobreexpresan *GGA1*.

El abordaje de un análisis funcional de este gen en poroto nos permitirá investigar además si el gen *GIP1* posee un rol en la nodulación. Hay antecedentes de que en la simbiosis micorrízica entre *Piriformospora* y cebada (*Hordeum vulgare*), la infección del hongo provoca una marcada atenuación en los niveles de expresión de *HvBI-1*, sugiriendo que este hongo interfiere con la maquinaria de la muerte celular programada del hospedador para así lograr evadir las respuestas de defensa y colonizar las raíces (Deshmukh *et al.*, 2006).

GIP#2 codificaría para una proteína de función aún desconocida que posee un dominio C2 en su secuencia. Este tipo de dominio ha sido identificado en quinasas de proteína dependientes de calcio. Las proteínas que contienen el dominio C2 participan en varios procesos intracelulares, entre los que se destacan el tráfico de proteínas, activación de GTPasas, control de la fosforilación y la generación de mensajeros secundarios de tipo lipídicos (Nalefski & Falke, 1996). En un principio fue identificado como un módulo intracelular de unión a calcio de la proteína quinasa C (PKC), y desde entonces se encontró este dominio en más de 100 proteínas, cuya función va desde la traducción de señales hasta el tráfico vesicular. En el

primer caso, la función de estas enzimas sería la de generar mensajeros secundarios de naturaleza lipídica (Ej.: fosfolipasas A y C: PLA: *Phospholipase A* y PLC: *Phospholipase C*) y fosfatidil-inositol 3-quinasas, fosforilación de proteínas (Ej.: PKC: *protein kinase C*) y activación de GTPasas (Ej.: Ras-GAP). La PLC hidroliza fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato a diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, que actúan como mensajeros secundarios (Rhee *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1991). También se encuentra presente en proteínas que participan en el tráfico vesicular, como sinaptotagminas, proteínas sensoras de calcio y capaces de interactuar con AP-2 (Perin *et al.*, 1990, 1991; Zhang *et al.*, 1994), rabfilina 3 (Shirataki, 1993), RIM (Wang *et al.*, 1997) y Munc (Südhof, 1996), y en proteínas que ligan ubiquitina (*e.g.* Nedd4, Plant *et al.*, 1994) e inactivan GTPasas (Trahey, 1988).

Finalmente, GIP#3 estaría asociado a senescencia, sin embargo, dada la heterogeneidad de proteínas implicadas en este proceso, la asignación funcional de esta proteína resulta incierta. Entre los genes asociados a senescencia, se pueden mencionar aquellos que codifican para enzimas relevantes en la fotosíntesis y metabolismo energético, hidrolasas, como DNAsas, RNAsas, proteasas, fosfolipasas, etc. Por otro lado, también presentó homología a un citocromo P450 (CYP450). En las plantas, participan en la biosíntesis de productos secundarios (Ej.: flavonoides, alcaloides) y de hormonas, así como en la desintoxicación de herbicidas (Bolwell *et al.*, 1994). La localización subcelular del complejo CYP450 en las plantas no es tan específica como en los mamíferos. Generalmente puede variar en su localización, por ejemplo es posible encontrarlo en el retículo endoplásmico, membrana plasmática, vacuola, mitocondria y aparato de Golgi (Madyastha *et al.* 1977, Kjellbom *et al.* 1985). En plantas, la familia del CYP450 está involucrada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos, tales como fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos, los cuales tienen una función en los procesos moleculares de interacción planta-patógeno y en la defensa a nivel bioquímico en contra de depredadores de plantas, respectivamente (Durst, 1991). Adicionalmente, en estudios recientes, diversos autores han reportado que la familia del CYP450 participa activamente en la biosíntesis de fitorreguladores de crecimiento como giberelinas, ácido abscísico y brasinoesteroides (Fujioka & Ylota 2003, Saito *et al.* 2004). Es importante mencionar que estas subfamilias del CYP450 se localizan principalmente en tejidos fotosintéticos (Froehlich *et al.* 2001). Existen otras subfamilias como CYP74C y CYP74D, que se localizan en el sistema radical y tejidos no fotosintéticos, cuya función no es muy clara en los procesos de defensa contra patógenos (Morant *et al.* 2003).

A pesar de la unión de estas proteínas con el *bait* en el sistema de doble híbrido, los datos de levadura no permiten concluir que las interacciones encontradas sean reales. Para

demostrarlas hay que llevar a cabo otros ensayos que permitan confirmar los resultados obtenidos con técnicas más específicas, *in vitro*, como la *pull-down* y coimmunoprecipitación o *in vivo*, donde las interacciones pueden ser evaluadas *in planta* mediante bimolecular fluorescence complementation (BiFC) a través de la agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*.

A partir de estos estudios, y los que están siendo llevados a cabo actualmente en el laboratorio, se espera poder avanzar en los mecanismos moleculares que participan en la señalización y que determinan una regulación diferencial de procesos como tráfico de vesículas y senescencia en la interacción de poroto y rizobios que han coevolucionado.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

Los estudios sobre la simbiosis del poroto demostraron una afinidad mutua entre porotos y linajes de la especie *R. etli* de la misma región de diversificación genética del hospedador. Estos resultados permitieron proponer la coevolución de los simbioses en las regiones de diversificación. En este trabajo de tesis se avanzó en el conocimiento de esa interacción hospedador x linaje de rizobio, a través del estudio de otros rasgos fisiológicos y moleculares. La planta de poroto ajusta las respuestas que preceden a la formación de nódulos, y también, en el período de fijación, dependiendo de la afinidad que presenta hacia la cepa de rizobio. Hemos demostrado que las combinaciones más afines desarrollan mayor número de hilos de infección y de nódulos, además de acumular niveles de materia seca superiores en la parte aérea de la planta. Nuestro trabajo describe cómo la mayor competitividad por la nodulación se revela en etapas tempranas de la interacción y que la afinidad entre simbioses podría estar asociado al mayor beneficio que le representa a la planta su asociación con determinadas cepas de rizobios. Nuestros resultados también han mostrado que el factor de nodulación no es la señal determinante de la afinidad resultante de la coevolución entre el poroto y los rizobios de los centros de diversificación. Este resultado deja abierto a futuras investigaciones, la posibilidad de otras moléculas del rizobio con potencialidades para mediar en el proceso selectivo de cepas. Los componentes superficiales de la bacteria tales como lipolisacáridos y exopolisacáridos son potenciales candidatos para esos estudios.

La caracterización funcional de los genes de poroto que presentan niveles de expresión diferenciales en la interacción simbiótica en general y en la determinación de especificidad de la asociación en particular, es motivo de estudio en nuestro laboratorio. En este sentido, la transformación de poroto ha representado una herramienta muy útil para el estudio del rol de genes implicados en la simbiosis.

Por otra parte, estudiamos el gen *PvGGA1* de poroto, que codificaría una GGA, que participa en el tráfico de proteínas en vesículas entre distintos compartimentos celulares. Mediante un análisis funcional por genética reversa pudimos evaluar que tanto la reducción como la sobreexpresión en los niveles de transcripto de *PvGGA1* presentaron un fenotipo asociado a la interacción más eficiente. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que además de componentes del rizobio que determinan una mayor capacidad competitiva, la planta poseería además una serie de genes cuya expresión coordinada es esencial para el establecimiento de un “diálogo molecular” especializado en las interacciones de mayor afinidad.

Recientemente se han descrito una serie de ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio cuyos resultados demuestran la participación de una GTPasa monomérica de la familia de las Rabs en la nodulación de poroto (Blanco *et al.*, 2009), además de la identificación de un cDNA expresado diferencialmente en plantas inoculadas con SC15 con alta homología a las ARF-GAPs (Peltzer *et al.*, 2008). Este hallazgo determina un escenario de respuesta de poroto que converge en la expresión de varios genes relacionados con el tráfico vesicular. Un análisis más profundo de la función de estos genes en la simbiosis es vital para dilucidar si este proceso es blanco de modulación en las interacciones más eficientes.

La determinación del genoma de poroto se encuentra actualmente en marcha a través de un consorcio promovido por CYTED, que involucra a varios laboratorios latinoamericanos y españoles. El análisis de la función de otros genes de poroto se verá ampliamente facilitado una vez que culmine la secuenciación del genoma. La culminación de la secuenciación (633 millones de pares de bases) se encuentra próxima, pero se espera que llevará aproximadamente un año en completar el ensamblado y la anotación de cromosomas y genes. La disponibilidad de esta información tendrá un gran impacto en general y en el avance y diseño de experimentos específicos para estudiar los genes que identificamos previamente y que han ido surgiendo en el transcurso de investigaciones llevadas a cabo actualmente en nuestro laboratorio. Por ejemplo, nos será de gran utilidad disponer la información de la región 5' de los genes para estudiar la regulación de la expresión a través de fusiones génicas. Asimismo, nos permitirá encarar estudios de genómica comparativa entre los porotos mesoamericanos y andinos con el propósito de identificar secuencias asociadas con la diversificación tales como polimorfismos, y divergencias en las señales de activación génica. Por otro lado, el conocimiento tendrá aplicación en programas de mejoramiento genético para mejorar los rasgos de calidad de la semilla y rendimiento del cultivo. Un objetivo de la selección de variedades es la generación de marcadores moleculares de genes o QTLs relacionados con el incremento en la producción agrícola y la preservación de la biodiversidad. Toda esta información permitirá crear nuevas variedades o hacer mejoras genéticas convencionales a nivel de laboratorio para luego transferir esas cualidades a los campos de siembra. Además, se podrá integrar la secuencia del poroto a la de otras leguminosas ya secuenciadas tales como *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* y *Glycine max*, permitiendo encarar estudios de genómica comparativa entre leguminosas y hacer uso de los avances obtenidos en las leguminosas modelo en el aspecto de la simbiosis.

Probablemente, en los próximos años se avance en la respuesta a los interrogantes que surgieron en este trabajo de tesis sobre los determinantes de la afinidad ocurrida durante la

coevolución del hospedador y el rizobio. Más aun, con expectativas puestas en comprender los mecanismos que subyacen al establecimiento de interacciones más eficientes.

Variedad mesoamericana Nag12

	SC15		CFNX5		136N3		138N1		55N1		136N2		1373		152N3	
	Media	±DS														
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	5.22	1.25	3.33	1.41	5.44	1.11	9.89	2.10	1.00	0.24	2.22	1.16	3.11	1.02	3.00	0.93
5	8.89	2.00	7.89	2.58	10.44	1.85	17.89	1.98	4.33	1.08	7.11	2.12	8.33	1.03	6.11	1.45
6	12.33	2.82	10.78	2.43	12.56	1.63	21.44	2.21	5.89	1.17	11.22	2.86	12.56	1.24	9.78	1.63
7	18.78	3.06	15.78	2.48	16.78	1.82	25.89	2.37	8.44	1.63	14.56	3.23	14.68	1.46	11.78	1.68

Tabla suplementaria 1.1. Formación de nódulos por cepas de rizobio predominantes en suelos mesoamericanos y andinos. El seguimiento en el número de nódulos formados en las plantas se realizó periódicamente desde los 3 hasta los 7 días post inoculación. Se calculó el número de nódulos promedio por planta (\pm DS). Por cada tratamiento se inocularon 9 plantas (número total de plantas analizadas: 72). Otras 6 se emplearon como testigo sin inocular.

Variedad andina Alubia

	SC15 ^a		CFNX5 ^a		136N3 ^a		138N1 ^b		55N1 ^a		136N2 ^a		1373 ^c		152N3 ^a	
	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS	Media	±DS
4	12.75	3.30	10.75	4.79	7.75	2.42	5.14	2.21	13.00	3.27	12.50	3.23	19.38	3.93	18.63	2.50
5	23.75	5.54	21.50	9.04	14.75	4.25	9.14	3.73	27.63	5.91	27.00	7.47	40.25	7.67	37.75	7.00
6	41.75	9.91	30.75	11.03	23.13	6.28	13.29	5.25	41.25	8.03	36.17	8.99	66.88	11.18	57.36	9.69
7	54.00	10.61	48.50	15.08	32.50	8.57	18.71	7.29	51.13	9.33	49.67	10.67	85.50	12.74	71.75	12.04
8	69.75	11.71	69.50	13.11	40.13	10.14	29.57	7.83	64.00	10.12	63.17	11.51	108.63	13.00	89.38	14.19

Tabla suplementaria 1.2. Patrón de nodulación temporal de Alubia. El seguimiento en el número de nódulos formados en las plantas se realizó periódicamente desde los 4 hasta los 8 días post inoculación. Se indica el número promedio de nódulos por planta (\pm SD). Por cada tratamiento se inocularon 8 plantas (número total analizadas: 64). Como testigos se emplearon 6 repeticiones sin inoculante y sin nitrógeno.

	SC15	CFNX5	136N3	138N1	55N1	136N2	1373	152N3	NO ₃	CT
Nag12	0.79	1.06	0.88	0.78	0.58	0.74	0.45	0.75	1.45	0.25
	±0.12	±0.30	±0.35	±0.14	±0.12	±0.29	±0.09	±0.19	±0.08	±0.09
Alubia	0.61	0.70	0.80	1.65	1.35	1.07	1.03	1.31	1.46	0.14
	±0.28	±0.52	±0.20	±0.38	±0.64	±0.09	±0.36	±0.50	±0.22	±0.05

Tabla suplementaria 1.3. Peso seco parte aérea (g/planta). La materia seca acumulada en la parte aérea de plantas de poroto de las variedades mesoamericana y andina se determinó a los 30 dpi. La media se obtuvo de promediar el valor de materia seca de 5 plantas por tratamiento (\pm SD).

Número de nódulos promedio por raíz en las <i>Hairy Roots</i> Nag12 luego de la inoculación con <i>R. etli</i>				
DPI	<i>Gus</i> RNAi	<i>Gus</i> RNAi	<i>PvRHS24-17</i> RNAi	<i>PvRHS24-17</i> RNAi
	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1
3	0,34 ± 0,20	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,15 ± 0,108
5	4,03 ± 2,52	1,81 ± 0,65	0,77 ± 0,34	2,58 ± 0,93
6	6,88 ± 4,52	3,28 ± 1,25	1,12 ± 0,40	3,74 ± 1,26
8	7,72 ± 4,41	3,38 ± 1,20	1,27 ± 0,59	3,87 ± 1,20
9	8,83 ± 3,92	3,46 ± 0,82	2,04 ± 0,57	5,30 ± 1,42
10	10,25 ± 4,27	3,76 ± 0,88	2,78 ± 0,66	6,44 ± 1,54

Tabla suplementaria 3.1 Cinética de nodulación en plantas compuestas Nag12 con niveles reducidos de *PvGGA1* y *Gus*. Se inocularon con las cepas SC15 y 55N1 de *R. etli*. Se muestra el valor promedio ± DE (desviación estándar) del número de nódulos en las “n” de raíces analizadas por tratamiento.

Número de nódulos promedio por raíz en las <i>Hairy Roots</i> Alubia luego de la inoculación con <i>R. etli</i>				
DPI	<i>Gus</i> RNAi	<i>Gus</i> RNAi	<i>PvRHS24-17</i> RNAi	<i>PvRHS24-17</i> RNAi
	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1
6	0,45 ± 0,22	1,74 ± 0,56	3,67 ± 1,14	1,77 ± 0,81
9	1,44 ± 0,51	2,62 ± 0,78	5,91 ± 1,86	2,85 ± 1,22
12	3,73 ± 1,09	4,85 ± 1,61	11,00 ± 4,29	4,27 ± 1,93
15	4,19 ± 1,30	7,09 ± 2,16	11,20 ± 4,42	4,59 ± 2,06

Tabla suplementaria 3.2. Cinética de nodulación en plantas compuestas Alubia con niveles reducidos de *PvGGA1* y *Gus*. Se inocularon con las cepas SC15 y 55N1 de *R. etli*. Se muestra el valor promedio ± DE (desviación estándar) del número de nódulos en las “n” de raíces analizadas por tratamiento.

Número de nódulos promedio por raíz en las <i>Hairy Roots</i> Nag12 luego de la inoculación con <i>R. etli</i>				
DPI	35S:GFP-GUS	35S:GFP-GUS	35S: <i>PvGGA1</i>	35S: <i>PvGGA1</i>
	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1	<i>R. etli</i> SC15	<i>R. etli</i> 55N1
3	0,14 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,20	0,00 ± 0,00
5	3,46 ± 1,00	0,50 ± 0,20	16,55 ± 4,19	1,72 ± 0,74
7	6,41 ± 1,95	1,67 ± 1,17	34,30 ± 8,90	4,96 ± 1,80
9	8,00 ± 2,92	3,94 ± 2,19	37,10 ± 9,52	8,10 ± 1,96
11	10,55 ± 3,17	8,89 ± 2,54	39,45 ± 10,40	9,07 ± 2,66

Tabla suplementaria 3.2. Patrón de nodulación temporal de plantas que sobreexpresan GFP-GUS y *PvGGA1*. Las plantas se transformaron con *A. rhizogenes* transformadas con el plásmido indicado. Las *hairy roots* se inocularon con *R. etli* SC15 y 55N1 y los nódulos se contaron a distintos tiempos luego de la inoculación (dpi). Cada valor representa el número de nódulos por raíz ± SD.

Bibliografía

- ⇒ **Abazeed ME. & Fuller, RS.** (2008). Yeast Golgi-localized, -Ear- containing, ADP-Ribosylation Factor-binding Proteins Are but Adaptor Protein-1 Is Not Required for Cell-free Transport of Membrane Proteins from the *Trans*-Golgi Network to the Prevacuolar Compartment. *Molecular Biology of the Cell*, 19: 4826-4836.
- ⇒ **Abd-Alla M.H.** (1999). Autoregulation of soybean-*Bradyrhizobium* nodule symbiosis is controlled by shoot or/and root factors. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15: 715-722.
- ⇒ **Agrios, G. N.** (1997). General overview of plant pathogenic organisms. In "Handbook of Pest Management". J. R. Ruberson, ed. CRC Press.
- ⇒ **Aguilar, O.M., López, M.V. Donato, M., Morón, B., Soria-Díaz, M.E., Clemente Mateos, C., Gil-Serrano, A., Sousa, C., Megías, M.** (2006). Phylogeny and nodulation signal molecule of rhizobial populations able to nodulate common beans -other than the predominant species *Rhizobium etli*- present in soils from the Northwest of Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 573-586.
- ⇒ **Aguilar, O.M., Riva, O., & Peltzer, E.** (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13548-13553.
- ⇒ **Althabegoiti, M.J., Lopez-Garcia, S.L., Piccinetti, C., Mongiardini, E.J., Perez-Gimenez, J., Quelas, J.I., Peticari, A., and Lodeiro, A.R.** (2008). Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiol Lett*, 282:115-123.
- ⇒ **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.
- ⇒ **Amarger, N.** (2001). Rhizobia in the field. 2001. *Adv. Agron*, 73:109-168.
- ⇒ **Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F** (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell*, 19(9):2866-85.

- ⇒ **Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.** (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, 303: 1364-1367.
- ⇒ **Arrighi JF., Barre A., Amor BB., Bersoult A., Campos Soriano L., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet EP., Ghérardi M., Huguet T., Geurts R., Dénarié J., Rougé P. y Gough C.** (2006). The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol*, 142:265–279.
- ⇒ **Balbi V. and Devoto A.** (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*, 177: 301-318.
- ⇒ **Banba M, Siddique A-BM, Kouchi H, Izui K, Hata S.** (2001). *Lotus japonicus* forms early senescent root nodules with *Rhizobium etli*. *Mol Plant- Microbe Interact*, 14: 173-180.
- ⇒ **Bauer, P., Ratet, P., Crespi, M.D., Schultze, M. and Kondorosi, A.** (1996) Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnod12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant Journal*, 10: 91-105.
- ⇒ **Bauer, P., Poirier, S., Ratet, P. and Kondorosi, A.** (1997). MsEnod12A expression is linked to meristematic activity during development of indeterminate and determinate nodules and roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10:39- 49.
- ⇒ **Baulcombe, DC.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363.
- ⇒ **Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M.C. & Tohme, J.** (2001). Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crop Science*, 41:854-862.
- ⇒ **Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK.** (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 55:504.
- ⇒ **Bernal, G. and Graham, P. H.** (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol*,47 (6):526-534.
- ⇒ **Birnbaum, K., Shasha, DE., Wang, JY., Jung, JW., Lambert, GM., Galbraith, DW., et al.,** (2003). A Gene Expression Map of the *Arabidopsis* Root. *Science*, 302 n (5652):1956-1960.
- ⇒ **Birnboim HC, Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979 Nov 24;7 (6):1513-23.

- ⇒ **Black, M.W. & Pelham, H.R.** (2000). A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J. Cell Biol.* 151: 587–600.
- ⇒ **Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, Aguilar OM.** (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.* 21(9):2797-810.
- ⇒ **Bolanos-Vásquez, M. C. & Werner, D.** (1997). Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv *phaseoli* on *nod* gene-inducing flavonoids in root extracts of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 10: 339-346.
- ⇒ **Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F. & Brisson, L.F.** (2003). Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta*, 216: 377-386.
- ⇒ **Bolwell G.P., Bozak K. y Zimmerlin A.** (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* 37, 1491–1506
- ⇒ **Boman AL, Zhang CJ, Zhu X, Kahn RA.** (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans Golgi. *Mol Biol Cell*, 11:1241-1255.
- ⇒ **Boman AL.** (2001). GGA proteins: new players in the sorting game. *J Cell Sci*, 114(Pt 19):3413-8.
- ⇒ **Bond, J.E. & Gresshoff, P.M.** (1993). En: *Plant Responses to the Environment*. Gresshoff, P.M. ed. *CRC Press*, 25-44.
- ⇒ **Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM. , Bonifacino JS** (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol*, 49(1):81-94.
- ⇒ **Bonifacino, JS., Traub, LM.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem*, 72: 395-447.
- ⇒ **Bonifacino JS.** (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5:23-32.
- ⇒ **Bradley DJ, Kjellborn P, Lamb CJ.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70,21–30.
- ⇒ **Brewin, N.J.** (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 293-316.

- ⇒ **Broughton, W. J. and Perret X.** (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2: 305-311.
- ⇒ **Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J.** (2003). Beans (*Phaseolus spp.*)- model food legume. *Plant Soil* 252: 55-128.
- ⇒ **Bueno, P., Soto, M. J., Rodríguez-Rosales, M. P., Sanjuan, J., Olivares, J., and Donaire, J. P.** (2001). Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol.* 152:91-96.
- ⇒ **Burn, J., Rossen, L. and Johnston, A. W. B.** (1987). Four classes of mutations in the *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* that affect its ability to autoregulate and/or activate other nod genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes dev*, 1: 456-464.
- ⇒ **Caetano-Anolles G. and Favelukes G.** (1986). Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa. *Appl Environ Microbiol*, 52: 377-382.
- ⇒ **Caetano-Anolles, G. and P. M. Gresshoff** (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol*, 45: 345-82.
- ⇒ **Campalans, A., Kondorosi, A. and Crespi, M.** (2004). Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 16:1047-1059.
- ⇒ **Capoen W., Oldroyd G.** (2008). How CYCLOPS keeps an eye on plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci.USA* 105 (51) 20053-4.
- ⇒ **Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol*, 29(3):453-64.
- ⇒ **Cardenas L, Holdaway-Clarke TL, Sanchez F, Quinto C, Feijo JA, Kunkel JG, Hepler PK.** (2000). Ion changes in legume root hairs responding to nod factors. *Plant Physiol* 123: 443-452.
- ⇒ **Cárdenas L., Jane E. Thomas-Oates, Noreide Nava, Isabel M. López-Lara, Peter K. Hepler, and Carmen Quinto** (2002). The Role of Nod Factor Substituents in Actin Cytoskeleton Rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plan. Mol. Interact*, 16(4): 326-334.

- ⇒ **Carthew, RW.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:244-248.
- ⇒ **Charon C, Johansson C, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M.** (1997). *ENOD40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA*.1997; 94:8901-8906.
- ⇒ **Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M.** (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* /doi/10.1105/tpc.108.063255.
- ⇒ **Cheon, C. I., Lee, N. G., Siddique, A. B., Bal, A. K., & Verma, D. P.** (1993). Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *EMBO J.*, 12: 4125-4135.
- ⇒ **Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL.** (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca²⁺ - dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*; 65:1043-1051.
- ⇒ **Colebatch, G., Kloska, S., Trevaskis, B., Freund, S., Alt mann, T., and Udvardi, M. K.** (2002). Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15: 411-420.
- ⇒ **Collins BM, Watson PJ, Owen DJ.** (2003) The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs. *Dev Cell*, 4: 321-332.
- ⇒ **Combier, JP., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernié, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., Niebel. A.** (2006). *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev*, 15 (22): 20.
- ⇒ **Combier JP, Kuster H, Journet EP, Hohnjec N, Gamas P, Niebel A** (2008). Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1. *Mol Plant Microbe Interact*, 21:1118-1127.
- ⇒ **Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 7(1): 43-55.

- ⇒ **Cooper JB, Long SR.** (1994). Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell*, 6(2):215-225.
- ⇒ **Corich, V., Goormachtig, S., Lievens, S., Van Montagu, M., & Holsters, M.** (1998). Patterns of *ENOD40* gene expression in stem-borne nodules of *Sesbania rostrata*. *Plant Mol. Biol*, 37: 67-76.
- ⇒ **Corvera, A., Promé, D., Promé, J.-C., Martínez-Romero, E., & Romero, D.** (1999). The *noll* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:3:236-246.
- ⇒ **Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., and Payne, G. S.** (2001). Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* 12: 1885-1896.
- ⇒ **Crespi, M. D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E.** (1994). *ENOD40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J*, 13: 5099-5112.
- ⇒ **Crespi, M., & Galvez, S.** (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *J Plant Growth Regul*, 19: 155-166.
- ⇒ **Curtis, M.D. & Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant. Physiol* 133, 462-469.
- ⇒ **D'Haese, W., Gao, M. S., De Rycke, R., van Montagu, M., Engler, G. & Holsters, M.** (1998). Rules for azorhizobial Nod factors and surface polyssacharides in intercellular invasion and nodule penetration, respectively. *Mol. Plant-Microbe interact*, 11: 999-1008.
- ⇒ **Danso, S.K.A., G. Hardarson y F. Zapata.** (1993). Misconceptions and practical problems in the use of ¹⁵N soil enrichment techniques for estimating N₂ fixation. *Plant Soil*, 152: 25-52.
- ⇒ **Dart P.J., Day J.M. y Harris D.** (1972). Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. pp. 85-100. *In*: FAO/IAEA (ed.). Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. FAO. Vienna, Austria.
- ⇒ **Dazzo FB, Napoli CA & Hubbell DH** (1976) Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Appl Environ Microbiol* 48: 1140-1150.

- ⇒ **Dazzo FB, Truchet GL, Sherwood JE, Hrabak EM, Abe M, Pankratz SH.** (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol*, 48:1140–50.
- ⇒ **de Bruijn, F.J.** (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
- ⇒ **De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P.** (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, 271(5255):1533-9.
- ⇒ **De Lajudie, P.; Laurent-Fulele, E.; Willems, A.; Torck, U.; Coopman, R.; Collins, M.D.; Kersters, K.; Dreyfus, B. & Gillis, M.** (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48:1277.
- ⇒ **De Lajudie, P.; Willems, A.; Nick, G.; Moreira, F.; Molouba, F.; Hoste, B.; Torck, U.; Neyra, M.; Collins, M.D.; Lindstrom, K.; Dreyfus, B. & Gillis, M.** (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48: 369.
- ⇒ **Dell'Angelica EC., Puertollano R., Mullins C., Aguilar RC., Vargas JD., Hartnell LM., & Bonifacino J.** (2000) GGAs: A Family of ADP Ribosylation Factor-binding Proteins Related to Adaptors and Associated with the Golgi Complex. *The Journal of Cell Biology*, 1 (19): 81-93.
- ⇒ **Dénarié J. & Cullimore J.** (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, 74: 951–954.
- ⇒ **Dénarié J., Debelle F. & Promé J.C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem*, 65: 503-535.
- ⇒ **Denison RF, Kinraide TB.** (1998). Oxygen-Induced Membrane Depolarizations in Legume Root Nodules (Possible Evidence for an Osmoelectrical Mechanism Controlling Nodule Gas Permeability). *Plant Physiol*, 108(1):235-240.
- ⇒ **Denison, R. F.** (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat.* 156, 567–576.
- ⇒ **Deshmukh S., Hückelhoven R., Schäfer P., Imani J., Sharma M., Weiss M., Waller F., & Kogel K.** (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica*

- requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *PNAS* 103, 18459-18457.
- ⇒ **D'Haese W. y Holsters M.** (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12, 79-105.
- ⇒ **Diaz CL, Logman T, Stam HC, Kijne JW.** (1995). Sugar-Binding Activity of Pea Lectin Expressed in White Clover Hairy Roots. *Plant Physiol*, 109(4):1167-1177.
- ⇒ **Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D.R.** (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351.
- ⇒ **Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E.** (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, 7: 1522-1530.
- ⇒ **Dongxue Li, Mark Kinkema, Peter M. Gresshoff** (2009). Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*. 166: 955-967.
- ⇒ **Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. & Kornfeld, S.** (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* 297: 1700-1703.
- ⇒ **Douglas A.E.** (1994) Symbiotic Interactions. Oxford, New York, Toronto, *Oxford University Press*. Vol 148.
- ⇒ **Downie, J.A.** (1994). Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol*, 2:318-324.
- ⇒ **Dreyfus M, Lahav J.** (1988). The build-up of the thrombospondin extracellular matrix. An apparent dependence on synthesis and on preformed fibrillar matrix. *Eur J Cell Biol*. 47(2):275-82.
- ⇒ **Ehrhardt, D.W., Wais, R. & Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, 85: 673-681.
- ⇒ **Eisenschenk L, Diebold R, Perez-Lesher J, Peterson AC, Kent Peters N, Noel KD.** (1994). Inhibition of *Rhizobium etli* Polysaccharide Mutants by *Phaseolus vulgaris* Root Compounds. *Appl Environ Microbiol*, 60(9):3315-22.
- ⇒ **Eisenschenk L, Diebold R, Perez-Lesher J, Peterson AC, Kent Peters N, Noel KD.** (1994). Inhibition of *Rhizobium etli* Polysaccharide Mutants by *Phaseolus vulgaris* Root Compounds. *Appl Environ Microbiol*, 60(9):3315-22.

- ⇒ **Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. & Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
- ⇒ **Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Diaz-Camino C, Santana O, Murillo E, Guillen G, Sanchez-Guevara N, Acosta J, Quinto C, et al.** (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(12):1385-1393.
- ⇒ **Evans, J. P., D. Gallesi, C. Mathieu, M. J. Hernández, M. de Felipe, B. Halliwell, & A. Puppo** (1999). Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* 208: 73-79.
- ⇒ **Fang, Y.W. and Hirsch, A.M.** (1998) Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiology*, 116: 53-68.
- ⇒ **Fanghanel, J. & G. Fischer** (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *Front. Biosci.* 9: 3453-3478.
- ⇒ **Faust, H.** (1986). ¹⁵N in biological nitrogen fixation Studies: A bibliography. *Zfl-Mitteilungen* 114: 3-120.
- ⇒ **Ferguson B.J. , Mathesius M.** (2003). Signalling interactions during nodule development. *Journal of plant growth regulation.* 22:47-72.
- ⇒ **Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB.** (2005). Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol*, 138: 2396.
- ⇒ **Fields S.** (1993). Dispensing biotechnology products. *Am Pharm*, 33(3):28-9.
- ⇒ **Fields, S., and O. Song.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* (London) 340:245-246.
- ⇒ **Fisher R.F. & Long S.R.** (1992) *Rhizobium*–plant signal exchange. *Nature*, 357: 655-660.
- ⇒ **Folch-Mallol J. L.; Marroquí S.; Sousa C.; Manyani H.;López-Lara I. M.; van der Drift K. M. G. M.;Haverkamp J.; Quinto C.; Gil-Serrano A.; Thomas-OatesJ.; Spaink H. P. Megías M.** (1996). Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of nodH and nodPQ genes in their sulfation. *Mol Plant Microbe Interact.* 9 (3):151–163.
- ⇒ **Foucher, F., & Kondorosi, E.** (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol. Biol.*, 43: 773-786.

- ⇒ **Froehlich, J. E.; Itoh, A. and Howe, G. A.** (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 125:306–317.
- ⇒ **Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczyglowski K** (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci:* 13:115-120.
- ⇒ **Fujioka, S. and Yokota, T.** (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:137–164.
- ⇒ **Gage Daniel J.** (2002). Analysis of Infection Thread Development Using Gfp- and DsRed-Expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 184: 7042-7046.
- ⇒ **Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2): 280-300.
- ⇒ **Gamas, P., Niebel Fde, C., Lescure, N. & Cullimore, J.** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, 9(4):233-42.
- ⇒ **Geelen, D., Mergaert, P., Geremia, R. A., Goormachtig, S., Van Montagu, M. & Holsters, M.** (1993). Identification of *nodSUIJ* genes in Nod locus of *Azorhizobium caulinodans*: Evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol. Microbiol.* 9: 145-154.
- ⇒ **Geldner N** (2004). The plant endosomal system: its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 219: 547–560.
- ⇒ **Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., van Montagu, M. & Holsters, M.** (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2669-2673.
- ⇒ **Geurts, R., Fedorova, E. & Bisseling, T.** (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* 8:346–352.
- ⇒ **Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42:413–441.
- ⇒ **Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y.** (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science:* 316: 1307-1312.

- ⇒ **Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Muñoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE.** (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, 441(7097):1149-52.
- ⇒ **González, J.E., Reuhs, B.L., and Walker, G.C.** (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8636-8641.
- ⇒ **Gonzalez-Rizzo S., Crespi M. & Frugier F.** (2006).The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, 18: 2680-2693.
- ⇒ **Grageda-Cabrera, O.A., Vera-Núñez, J.A., Castellanos, J.Z., Peña-Cabriales, J.J.** (2003). Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *TERRA Latinoamericana*, 21 (1) 65-71. Universidad Autónoma Chapingo México.
- ⇒ **Graham, P.H., & Vance, C.P.** (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol.* 131: 872-877.
- ⇒ **Gu, F., Crump, CM. & Thomas, G.** (2001). Trans Golgi network sorting. *Cell Mol. Life Sci.* 58:1067-1084.
- ⇒ **Hadri A.E. & Bisseling T.** (1998). Responses of the plant to Nod factors. In HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas, eds, *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 403–416.
- ⇒ **Hamel LP. & Beaudoin N.** (2010). Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant–microbe interactions. *Planta* DOI 10.1007/s00425-010-1215-9.
- ⇒ **Hamilton, AJ. & Baulcombe, DC.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- ⇒ **Hamilton, AJ., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, DC.** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 21: 4671-4679.
- ⇒ **Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532):1146-50.
- ⇒ **Hanahan D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli* Ch 6 in DNA cloning, VI, A practical approach. Ed Glover, D.M., Oxford, IRL.

- ⇒ **Hanin, M., S. Jabbouri, W. J. Broughton, R. Fellay, & D. Quesada-Vincens.** (1999). Molecular aspects of host-specific nodulation, p. 1–37. In G. Stacey and N. Keen (ed.), *Plant-microbe interactions*, vol. 4. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minn.
- ⇒ **Hannon GJ.** (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894):244-51.
- ⇒ **Hardham AR, Takemoto D, White RG** (2008). Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol* 8: 63.
- ⇒ **Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75:805816.
- ⇒ **Harrar, Y., Bellini C. and Faure J.D.** (2001) FKBP, at the crossroads of folding and transduction pathways. *Trends in Plant Sci.* 6 : 426-431.
- ⇒ **Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnell, S., et al.** (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* 142: 1739-1750.
- ⇒ **Heitman J, Movva NR, Hall MN** (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253: 905–909
- ⇒ **Herendeen PSS., Magallón-Puebla R., Lupia PR, Kobylinska J.** (1999). A preliminary conspectus of the Allon flora from the Late Cretaceous (late Santonian) of central Georgia, U.S.A. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 407-471.
- ⇒ **Hernandez-Lucas I.; Segovia L.; Martínez-Romero E.; Pueppke S.G.** (1995). Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *App. En_ironm. Microbiol.* 61: 2775-2779.
- ⇒ **Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 195-201.
- ⇒ **Hinnen, A., Hicks, J. B. & Fink, G. R.** (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933.
- ⇒ **Hirsch A.M. & La Rue T.A.** (1997). Is the legume nodule a modified root or stem or an organ “*sui generis*”? *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 361-392.
- ⇒ **Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG, Bisseling T.** (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1244-48.
- ⇒ **Hirsch AM.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122:211-237.

- ⇒ **Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A. & Oldroyd, G.E.** (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21:545-557.
- ⇒ **Hirst J, Lui WWY, Bright NA, Totty N, Seaman MNJ, Robinson MS.** (2000). A family of proteins with g-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the TGN and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*; 149:67–79.
- ⇒ **Hirst J., Seaman N.J., Buschow I.S. & Robinson S.M.** (2007). The Role of Cargo Proteins in GGA Recruitment. *Traffic* 8: 594–604.
- ⇒ **Hungria, M., Andrade, S. D., Chuceire, L. M. de O., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F. J., Megías, M.** (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 21: 1515-1528.
- ⇒ **Hungria, M., Joseph, C.M., & Phillips, D.A.** (1991) *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Physiology* 97:759-764.
- ⇒ **Ihara-Ohori Y., M. Nagano, S. Muto, H. Uchimiya, & M. Kawai-Yamada** (2007). **Cell Death Suppressor Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Is Associated with Calmodulin Binding and Ion Homeostasis.** *Plant Physiology*, 143(2): 650 - 660.
- ⇒ **Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li,D.,Nguyen, C.D.** (2010) Inactivation of duplicated nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.).*Plant Cell Physiol.* 51: 201- 214.
- ⇒ **Jabbouri, S.; Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., ReliD, B., Promé, J.-C., & Broughton, W. J.** (1995). Involvement of *nodS* in *N*-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors. *J. Biol. Chem.* 270, 22968–22973.
- ⇒ **James, P., J. Halladay, and E.A. Craig.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* 144:14251436.
- ⇒ **Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC.** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*; 5:619–33.
- ⇒ **Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC.** (2008) Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont

- Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:704–9.
- ⇒ **Josephson KL. & Pepper IL.** (1984). Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert *Soil Biol. Biochem.* 16, 651–655.
- ⇒ **Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP.** (2000). Cyclin-dependent kinase-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* 43, 607-620.
- ⇒ **Journet EP, Pichon M, Dedieu A, de Billy F, Truchet G, Barker DG** (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* 6(2):241-9.
- ⇒ **Jurgens G** (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 481–504.
- ⇒ **Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., et al.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-1789.
- ⇒ **Kami J, Velásquez VB, Debouck DG, Gepts P.** (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci.* 92(4):1101-4.
- ⇒ **Kamicker, B. J. & W. J. Brill.** (1986). Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:487–492.
- ⇒ **Kamst, E.; Spaink, H. P. & Kafetzopoulos, D.** (1998). Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. En Biswas, B. B. and Das, H. K. (eds.), Plant-microbe interactions-subcellular biochemistry. New York: *Plenum Press*, 29-71.
- ⇒ **Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103:359-364.
- ⇒ **Karimi, M., Inze, D., & Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7, 193-195.
- ⇒ **Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Koiwa H, Niwa S, Ikuta A, Syono K, Akao S.** (2002). Root, root hair, and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 5(1):17-26.

- ⇒ **Kawai-Yamada M, Jin L, Yoshinaga K, Hirata A, Uchimiya H.** (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12295–12300.
- ⇒ **Kawai-Yamada M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H.** (1999). Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett* 464: 143–147.
- ⇒ **Kawai-Yamada M.** (2007). Cell Death Suppressor Arabidopsis Bax Inhibitor-1Is Associated with Calmodulin Binding and Ion Homeostasis. *Plant Physiology* 143: 650–660.
- ⇒ **Kawai-Yamada, M.; Ohori, Y.; Uchimiya, H.** (2004). Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell*, 16, 21-32.
- ⇒ **Kieliszewski MJ, Lamport DT.** (1994). Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J*, 5(2):157-72.
- ⇒ **Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A. & Denison, R. F.** (2003). Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature* 425: 78-81.
- ⇒ **Kijne, J.W., Bakhuizen, R., van Biessel, A.A.N, Canter Cremers, H.C.J., Diaz, C.L., de Pater, B.S., Smit, G., Spauk, H.P., Swart, s., Wijffelman, C.A., & Lugtenberg, B.J.J.** (1992). The Rhizobium trap: Root hair curling in root-nodule symbiosis. In *Perspectives in Plant Cell Recognition, Society for Experimental Biology Seminar Series*, 48 (Cambridge, UK: Cambridge University Press), 267-284.
- ⇒ **Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb J., Szczyglowski K. & Parniske M.** (2005). Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* 17: 2217-2229.
- ⇒ **Kistner, C. & M. Parniske** (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* 7(11): 511-8.
- ⇒ **Kjellbom, P.; Larsson, C.; Askerlund, P.; Schelin, C. and Widell, S.** (1985). Cytochrome P–450/420 in plant plasma membranes: a possible component of the blue–light–reducible flavoprotein–cytochrome complex. *Photochem. Photobiol.* 42:779–783.
- ⇒ **Kondorosi E. & Kondorosi A.** (2004). Endoreduplication and activation of the anaphase promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters* 567:152-157.

- ⇒ **Kossland R. & Benbohlool B.** (1984). Suppression of Nodule Development of One Side of a Split-Root System of Soybeans Caused by Prior Inoculation of the Other Side. *Plant Physiol.* 75: 125-130.
- ⇒ **Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu GJ, Kumagai H, Tajima S, Suganuma N, Suzuki A, Aoki T, Hayashi M, Yokoyama T, Ohyama T, Asamizu E, Kuwata C, Shibata D, Tabata S.** (2004). Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res*, 31; 11(4):263-74.
- ⇒ **Kouchi, H. & Hata, S.** (1993). Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development, *Mol. Gen. Genet.*, 238: 106-119.
- ⇒ **Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M.** (2010). How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant Cell Physiol.* 51(9): 1381-1397.
- ⇒ **Krause, A., Lan, V.T., & Broughton, W.J.** (1997). Induction of chalcone synthase expression by rhizobia and nod factors in root hairs and roots. *Mol Plant Microbe Interact* 10, 388-393.
- ⇒ **Kreis TE, Pepperkok R.** (1994). Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 6(4):533-7.
- ⇒ **Krishnamurthy, K. V.** (1999). *Methods in Cell Wall Cytochemistry*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- ⇒ **Kunz J. & Hall MN.** (1993). Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* 18: 334–338
- ⇒ **Kuo, J., M. C. Chen, Lin, C. H. & L. S. Fang** (2004). Comparative gene expression in the symbiotic and aposymbiotic *Aiptasia pulchella* by expressed sequence tag analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 176–186.
- ⇒ **Kuppusamy KT, Endre G, Prabhu R, Penmetsa RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R, Vandenbosch KA.** (2004). LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol.* 136(3):3682-91.
- ⇒ **Laeremans T., Snoeck C., Mariën J., Verreth C., Martínez- Romero E., Promé J.C. & Vanderleyden, J.** (1999). *Phaseolus vulgaris* recognizes *Azorhizobium caulinodans*

- Nod factors with a variety of chemical substituents. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 820–824.
- ⇒ **Laeremans T. and Vanderleyden J.** (1998). Review: Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14: 787-808.
- ⇒ **Laguerre, G., Fernandez, M.P., Edel, V., Normand, P., & Amarger, N.** (1993). Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Bacteriol* 43: 761-767.
- ⇒ **Lam SK, Tse YC, Robinson DG, Jiang L.** (2007). Tracking down the elusive early endosome. *Trends Plant Sci* 12: 497–505.
- ⇒ **Le Borgne R, Hoflack B.** (1998). Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 10(4):499-503.
- ⇒ **Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Mailler, F., Truchet, G., Prome, J.C & Denarié, J.** (1990). Symbiotic host specificity *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344 :781-784.
- ⇒ **Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K** (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. *Curr Opin Plant Biol* 9: 621-630.
- ⇒ **Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A** (2006). Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18008-18013.
- ⇒ **Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O.** (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, 303: 1361-1364.
- ⇒ **Lievens S, Goormachtig S, Holsters M.** (2004). Nodule-enhanced protease inhibitor gene: emerging patterns of gene expression in nodule development on *Sesbania rostrata*. *J Exp Bot*, 55(394):89-97.
- ⇒ **Limpens, E. and Bisseling, T.** (2003). Signaling in symbiosis. *Curr. Op. Plant Biol.* 6: 343-350.
- ⇒ **Lipardi, C., Wei, Q. & Paterson, BM.** (2001). RNAi as random degradative PCR siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107: 297-307.

- ⇒ **Löbler M, Hirsch AM.** (1993). A gene that encodes a proline-rich nodulin with limited homology to PsENOD12 is expressed in the invasion zone of *Rhizobium meliloti*-induced alfalfa root nodules. *Plant Physiol*, 103(1):21-30.
- ⇒ **Lohar DP, Haridas S, Gantt JS, VandenBosch KA.** (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol*, 173:39-49.
- ⇒ **Lohar, D. P., Schaff, J. E., Laskey, J. G., Kieber, J. J., Bilyeu, K. D., & Bird, D. M.** (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J*, 38:203-14
- ⇒ **Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM** (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 92: 322–328.
- ⇒ **Lombardo F, Heckmann AB, Miwa H, Perry JA, Yano K, Hayashi M, Parniske M, Wang TL, Downie JA.** (2006). Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(12):1444-50.
- ⇒ **López-Lara I. M.; van der Drift K. M. G. M.; van Brussel A. A. N.; Haverkamp J.; Lugtenberg B. J. J.; Thomas-Oates J. E.; Spaink H. P.**(1995). Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2 *Plant Mol. Biol.*, 29: 465–477.
- ⇒ **Lorteau MA, Ferguson BJ, Guinel FC** (2001). Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol Plant.*, 112(3):421-428.
- ⇒ **Mabood F., Smith D.L.** (2005). Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiol.Plant.* 125: 311–323.
- ⇒ **Mabood F., Souleimanov A., Khan W., Smith D.L.** (2006) Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 759–765.
- ⇒ **Madigan MT** (2000). *Biology of microorganisms* (9° ed). Prentice Hall.
- ⇒ **Madriz-Ordeñana, K.** (2002). Mecanismos de defense en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) Nro. 63: 22-32.
- ⇒ **Madsen EB.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-40.

- ⇒ **Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A.M., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B.L., Bek, A.S., Ronson, C., James, E.K., Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications* 1: 1.
- ⇒ **Madyastha KM, Ridgway JE, Dwyer JG, Coscia CJ.** (1977). Subcellular localization of a cytochrome P-450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. *J Cell Biol*, 72(2):302-13.
- ⇒ **Magori S, Kawaguchi M** (2009). Long-distance control of nodulation: molecules and models. *Mol Cells*, 27: 129-134.
- ⇒ **Manen J-F, Simon P, Van Slooten J-C, Østeras M, Frutiger S, Hughes GJ.** (1991). A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *The Plant Cell* 3, 259–270.
- ⇒ **Markmann, K. & Parniske, M.** (2009). Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends Plant Sci.* 14:77-86.
- ⇒ **Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J.** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144:324-35
- ⇒ **Marx, J.** (2000). Interfering with gene expression. *Science* 288: 1370-1372.
- ⇒ **Matamoros MA., Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M.** (1999). Stress induced legume root nodule senescence: physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol* 121: 97–111.
- ⇒ **Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Sauter C., Rolfe B.G. & Djordjevic M.A.** (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation on white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14: 23-34.
- ⇒ **Mathesius, U., Charon, C., Rolfe, B. G., Kondorosi, A. & Crespi, M.** (2000). Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii inoculation or localized cytokinin addition. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 13: 617-628.
- ⇒ **Mattera R, Arighi CN, Lodge R.** (2003). Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex". *EMBO J.* 22 (1): 78–88.

- ⇒ **Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., & Mergaert, P.** (2008). Cell biology of nodule infection and development. 153–189. M.J. Dilworth et al. (eds.). *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. 153-189.
- ⇒ **McClellan PE, Lee RK, Miklas PN.** (2004). Sequence diversity analysis of dihydroflavonol 4-reductase intron 1 in common bean. *Genome*, 47(2):266-80.
- ⇒ **McClellan, P., Kami, J. & Gepts, P.** (2004). Genomic and genetic diversity in common bean. In RF Wilson, HT Stalker, EC Brummer, eds, *Legume Crop Genomics*. AOCSS Press, Champaign, IL, 60-82.
- ⇒ **McIver, J., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Bender, G. L. & Rolfe, B. G.** (1989). Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii caused by point mutations in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 97-106.
- ⇒ **Meier, I. & Brkljacic, J.** (2009). The nuclear pore and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 87-95.
- ⇒ **Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, Kondorosi E.** (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci*, 103(13):5230-5.
- ⇒ **Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M.** (1997). *Nod factors of Azorhizobium caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Mol Plant Microbe Interact*, 10(5):683-7.
- ⇒ **Mergaert, P., Van Montagu, M., & Holsters, M.** (1997), Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* 25: 811-817.
- ⇒ **Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O.** (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:5230-5235.
- ⇒ **Middleton, P.H., Jakab, J., Varma Penmetsa, R., Starker, C.G., Doll.** (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod Factor signal transduction. *Plant Cell*, 19: 1221-1234.
- ⇒ **Mironov, V. et al.** (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – the nexus. *Plant Cell*, 11: 509–522.
- ⇒ **Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A.** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development:

- Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4701-4705.
- ⇒ **Montealegre, C. & Kipe-Nolt, J.** (1994). Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. *Microbiology*, 162: 352-356.
- ⇒ **Montealegre, C. & Kipe-Nolt, J.** (1994). Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. *Arch. Microbiol.*: 162 352–356.
- ⇒ **Morant, M.; Bak, S.; Lindberg, M. B. and Werck-Reichhart, D.** (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnolgy*. 14:151–162.
- ⇒ **Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411:948-950.
- ⇒ **Müller, J., Wiemken, A., & Boller, T.** (2001). Redifferentiation of bacteria isolated from *Lotus japonicus* root nodules colonized by *Rhizobium* sp. NGR234. *J. Exp. Bot.*, 52: 2181-2186.
- ⇒ **Murakami, Y., Miwa, H., Imaizumi-Anraku, H., Kouchi, H., Downie, J.A.**(2006). Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Res.* 13: 255-265.
- ⇒ **Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315: 101.
- ⇒ **Mylona, P., K. Pawlowski, et al.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 7(7): 869-885.
- ⇒ **Nakagawa T, Kawaguchi M.** (2006) Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* 47: 176–180.
- ⇒ **Nalefski EA, Falke JJ.** (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, 5(12):2375-90.
- ⇒ **Ni X, Canuel M, Morales CR** (2006). The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol*, 21: 899–913.
- ⇒ **Noel KD, Vandenbosch KA, Kulpaca B.** (1986). Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J Bacteriol*, 168(3):1392-401.
- ⇒ **Noel, K.D.** (1992). Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes. *Molecular signals in plant-microbe communications*. 341-357.

- ⇒ **Nuc K., Nuc P. and Stomski R.** (2001) Yellow Lupine Cyclophilin Transcripts Are Highly Accumulated in the Nodule Meristem Zone. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1384–1394.
- ⇒ **Oka-Kira, E. & Kawaguchi, M.** (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 496-502.
- ⇒ **Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR** (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 13: 1835.
- ⇒ **Oldroyd GE.** (2007). Plant science. Nodules and hormones. *Science* 315:52–53.
- ⇒ **Oldroyd GE & Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 519-546.
- ⇒ **Ooki Y, Banba M, Yano K, Maruya J, Sato S, Tabata S, Saeki K, Hayashi M, Kawaguchi M, Izui K, Hata S.** (2005). Characterization of the *Lotus japonicus* symbiotic mutant lot1 that shows a reduced nodule number and distorted trichomes. *Plant Physiol.*, 137(4):1261-71.
- ⇒ **Pacios Bras C., Spaink H. P., Stuurman N.** (2000). Structure and Function of Nod Factors. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*; Triplett E. W., Ed.; Horizon Scientific: Wymondham, UK, pp 365–383.
- ⇒ **Pacios-Bras C, Yuri E.M. van der Burgt, Andre M. Deelder, Pablo Vinuesa, Dietrich Werner, Herman P. Spaink** (2002). Novel lipochitin oligosaccharide structures produced by *Rhizobium etli* KIM5s. *Carbohydrate Research*, 337:1193–1202.
- ⇒ **Pandey & Gritton** (1975). Genotypic and Phenotypic Variances and Correlations in Peas *Crop Sci*, 15: 353-356.
- ⇒ **Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, Lei W, Margaret I, López-Baena FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Moreno J, Ruiz-Sainz JE.** (2006). *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(1):43-52.
- ⇒ **Pariasca J.A.T.; Sunaga A.; Miyazaki T.; Hisaka H.; Sonoda M.; Nakagawa H.; Sato T** (2001). Cloning of cDNAs encoding senescence-associated genes, ACC synthase and ACC oxidase from stored snow pea pods (*Pisum sativum* L. var *saccharatum*) and their expression during pod storage. *Postharvest Biology and Technology*, 22 (3): 239-247.

- ⇒ **Parniske M, Schmidt PE, Kosch E, Müller P** (1994). Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact*, **5**: 631-638.
- ⇒ **Parniske M.** (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**: 320-328.
- ⇒ **Parniske M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, **6**: 763-775.
- ⇒ **Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 2004;234:201-62.
- ⇒ **Patterson, T.G. y T.A. LaRue.** (1983). N fixation: C and ureide content of soybean: Ureides as an index of fixation. *Crop Sci.* **23**: 825-831.
- ⇒ **Peltzer-Meschini, E., F. A. Blanco, M. E. Zanetti, M. P. Beker, H. Küster, A. Pühler & O. Mario Aguilar** (2008). Host genes involved in nodulation preference in common beans (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol Plant Microbe Interact.* **21**: 459-468.
- ⇒ **Peng H-M, Dreyer DA, VandenBosch KA, Cook D.** (1996). Gene structure and differential regulation of the *Rhizobium*-induced peroxidase gene *RIP1*. *Plant Physiol.* ;**11**:1437–1446.
- ⇒ **Penmetza RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR.** (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**: 998.
- ⇒ **Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C.** (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260–263
- ⇒ **Perin, M.S., Fried, V.A., Stone, D.K., Xie, X.-S., Südhof, T.C.** (1991) Structure of the 116 kDa polypeptide of the clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* **266**, 3877-3881.
- ⇒ **Perotto S., Brewin N.J. & Kannenberg E.L.** (1994) Cytological evidence of a host-defense that reduces cell and tissue invasion in pea nodule by lipopolisaccharide defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol Plant Microbe Interact.* **7**: 99-112.
- ⇒ **Perret, X., C. Staehelin, & W. J. Broughton** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- ⇒ **Perret, X.; Staehelin, C. & Broughton, W. J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:180-201.

- ⇒ **Phillips, D.A. & Streit, W.R.** (1996) Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In Stacey, G. and Keen, N.T. (eds.), *Plant Microbe Interactions*. Chapman and Hall, New York, 236-271.
- ⇒ **Pichon, M., Journet, E., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. & Barker, D.G.** (1992). *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* 4: 1199-1211.
- ⇒ **Pierce M, Bauer WD.** (1983). A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. *Plant Physiol.* 73(2):286-90.
- ⇒ **Pinero D., Martínez E., Selander R. K.** (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. *App. En_ironm. Microbiol.* 54: 2825-2832.
- ⇒ **Piper RC, Luzio JP** (2007). Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol* 19: 459-465.
- ⇒ **Plant, P. J., Yeager, H., Staub, O., Howard, P., & Rotin, D.** (1997) The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J. Biol. Chem.* 272, 32329-32336.
- ⇒ **Postgate, J.**(1998). *Nitrogen Fixation, 3rd Edition*. Cambridge University Pres, Cambridge UK.
- ⇒ **Poupot, R., Martinez-Romero, E. & Prome, JC.** (1993). Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or non-sulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosamine terminus. *Biochemistry* 32: 10430-10435.
- ⇒ **Poupot, R., Martinez-Romero, E., Gautier, N. & Prome, JC.** (1995). Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J. boil. Chem.* 270: 6050-6055.
- ⇒ **Pueppke SG, Broughton WJ.** (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact*, 12(4):293-318.
- ⇒ **Pueppke, S.G. & Broughton, W.J.** (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular PlantMicrobe Interactions*, 12: 293-318.
- ⇒ **Puertollano R, Randazzo PA, Presley JF, Hartnell LM, Bonifacino JS** (2001) The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 93–102.

- ⇒ **Puertollano R, Bonifacino JS.** (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* 6:244–251.
- ⇒ **Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH** (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* 165: 683–701.
- ⇒ **Quinto C., Wijffjes AHM, Bloemberg GV., Blok-Tip L., López Lara IM., Lugtenberg BJJ., Thomas-Oates JE, & Spaink HP.** (1997). Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4336–4341.
- ⇒ **Radutoiu S., Madsen LH., Madsen EB, Felle H., Umehara Y., Grønlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- ⇒ **Radutoiu S., Madsen LH., Madsen EB., Jurkiewicz A. Fukai E., Quistgaard Esben M H, Albrektsen AS., James EK., Thirup S., Stougaard J.** (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J*, 26: 3923-3935.
- ⇒ **Ramu, S. K., Peng, H. M. & Cook, D. R.** (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:522-528.
- ⇒ **Raymond, J., J.L. Siefert, C.R. Staples & R.E. Blankenship.** (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21:541–554.
- ⇒ **Relic, B., Perret, X., Estrada-Garcia, M. T., Kopcinska, J. Golinowski, W., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. & Broughton, WJ.** (1994). Nod-factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* 13: 171-178.
- ⇒ **Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY.** (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*.244(4904):546–550.
- ⇒ **Richardson M.** (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Rogers LJ, ed. Amino acids, proteins and nucleic acids. *Methods in plant biochemistry*, Vol. 5. London: Academic Press, 259–305.
- ⇒ **Riely, BK., Lougnon, G., Ane, JM. & Cook, DR.** (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.* 49: 208-216.

- ⇒ **Rizo J. & Súdhof T.C.** (1998). C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca²⁺-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 26:15879-15882.
- ⇒ **Robatzek S.** (2007). Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell Microbiol* 9: 1-8.
- ⇒ **Robertson, J. G. & P. Lyttleton** (1982). Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules of white clover. *J Cell Sci* 58: 63-78.
- ⇒ **Robinson MS, Bonifacino JS.** (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 13(4):444-53.
- ⇒ **Rodpothong P., John T. Sullivan, Kriangsak Songsrirote, David Sumpton, Kenneth W. J.-T. Cheung, Jane Thomas-Oates, Simona Radutoiu, Jens Stougaard, and Clive W. Ronson.** (2009). Nodulation Gene Mutants of *Mesorhizobium loti* R7A—*nodZ* and *nodL* Mutants Have Host-Specific Phenotypes on *Lotus* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact*-22-12-1546.
- ⇒ **Rojo, E., Solano, R., Sanchez-Serrano, J.J.** (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* 22:82-98.
- ⇒ **Romano, P., Gray, J., Horton, P., & Luan, S.** (2005). Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytol.* 166:753–769.
- ⇒ **Romero D.; Brom S., Martínez Salazar J., Girard M. L.;Palacios R., Dávila G.** (1991). Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173: 2435–2441.
- ⇒ **Rosas S., Soria R., Correa N., Abdala** (1998). Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 38: 1161-1168.
- ⇒ **Roth, L. E. & G. Stacey** (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol.* 49(1): 13-23.
- ⇒ **Roth, L. E., K. Jeon** (1988). Homology in endosymbiotic systems: the term «symbiosome.» St. Paul, ADS Press.
- ⇒ **Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M., Lecomte, P., Györgyey, J., Vaubert, D., et al.** (2003). The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol.*, 131:1091-1103.
- ⇒ **Ryan CA.** (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.

- ⇒ **Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E.** (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19:610-624.
- ⇒ **Saito, S.; Hirai, N.; Matsumoto, C.; Ohigashi, H.; Ohta, D.; Sakata, K. and Mizutani, M.** (2004). *Arabidopsis* CYP707A5 Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* 134:1439–1449.
- ⇒ **Sanchez P, de Torres Zabala M, Grant M.** (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J* 21: 393–399.
- ⇒ **Sandal N, Petersen TR, Murray J, Umehara Y, Karas B, Yano K, Kumagai H, Yoshikawa M, Saito K, Hayashi M, Murakami Y, Wang X, Hakoyama T, Imaizumi-Anraku H, Sato S, Kato T, Chen W, Hossain MS, Shibata S, Wang TL, Yokota K, et al.,** (2006). Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: recombinant inbred lines, comparative genetic maps, and map position of 35 symbiotic loci. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(1):80-91.
- ⇒ **Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. & Puppo, A.** (2001). Oxidative burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:86-89.
- ⇒ **Savoure A, et al.** (1994) Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago* microcallus suspensions. *EMBO J* 13(5):1093-1102.
- ⇒ **Scales SJ., Gomez, M., Kreis TE.** (2000). Coat proteins regulating membrane traffic. *Int Rev Cyto*, 195:67-144.
- ⇒ **Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402:191–95
- ⇒ **Scheres, B., van de Weil, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spink, H., van Eck, H.,** of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30.
- ⇒ **Schiene C. & Fischer G.** (2000). Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10: 40–45.
- ⇒ **Schlaman HR, Horvath B, Vijgenboom E, Okker RJ, Lugtenberg BJ.** (1991). Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J Bacteriol*, 173(14):4277-87.

- ⇒ **Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J. N., Endre, G., Gero, S. D., & Kondorosi, A.** (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of the plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:192-196.
- ⇒ **Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buire, M., & Kondorosi, A.** (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Internat. Reviews in Cytology* 156, 1-75.
- ⇒ **Segovia L.; Young J. P. W., Martínez-Romero** (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. E. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 43: 374–37.
- ⇒ **Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A. D. and de Vos, WM.** (1997). Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Mol. Ecol.* 6:601–608.
- ⇒ **Sevillano F. & Rodríguez Barrueco C.** (1987). Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en Agricultura. En: Avances en la biología de la Fijación de nitrógeno atmosférico. Eds: M. Megias y I. Ruiz. pp. 929. Universidad de Sevilla. Jurgensen y Davey. 1970.
- ⇒ **Sharma, S. B. & Signer, E. R.** (1990). Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon Tn5-gusA. *Genes Dev.* 4: 344-356.
- ⇒ **Shaw SL, Long SR.** (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol*,132:2196–204.
- ⇒ **Sheokand, S., Brewin, N.J.** (2003). Cysteine proteases in nodulation and nitrogen fixation. *Indian Journal of Experimental Biology* 41: 1124-1132.
- ⇒ **Shiba Y, Katoh Y, Shiba T, Yoshino K, Takatsu H, Kobayashi H, Shin HW, Wakatsuki S, Nakayama K.** (2004). GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J. Biol. Chem*, 279: 7105-7111.
- ⇒ **Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, Takai Y.** (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol*, 13(4):2061–2068.
- ⇒ **Sibold, LM., Possot OE. & J.P Aubert.** 1991. Nucleotide sequence of *nifH* regions from *Methanobacterium ivanovii* and *Methanosarcina barkeri* 227 and characterization of *glnB*-like genes. *Res. Microbiol.* 142:5-12.

- ⇒ **Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. & Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- ⇒ **Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. and Souza, V.** (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 884-893.
- ⇒ **Simms, E. L. & Taylor, D. L.** (2002). Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integr. Comp. Biol.* 42, 369–380.
- ⇒ **Singh S. P., P. Gepts & D.G. Debouck.** (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45: 379-396.
- ⇒ **Smit G, Swart S, Lugtenberg BJJ, Kijne JW.** (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6:2897–903.
- ⇒ **Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T & Geurts R** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor induced transcription. *Science* 308: 1789–1791.
- ⇒ **Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C. & Bisseling, T.** (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* 145: 183-191.
- ⇒ **Smith, D.R., L.A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, H. Safer, D. Patwell, S. Prabhakar, S. Mcdougall, G. Shimer, A. Goyal, S. Pietrokovski, G.M. Church, C.J. Daniels, J.-I. Mao, P. Rice, J. Nölling & J. Reeve.** (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179:7135-7155.
- ⇒ **Soltis, P.S., Soltis, D.E., Savolainen, V., Crane, P.R. & Barraclough, T.G.** (2002) Rate heterogeneity among lineages of tracheophytes: integration of molecular and fossil data and evidence for molecular living fossils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 4430-4435.
- ⇒ **Somasegaran, P. & Hoben, H.J.**(1994). Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, 450.
- ⇒ **Spaink, HP., Wijffelman, CA., Pees, E., Oker, RJH. & Lugtenberg, BJJ.** (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature*, 328: 337-340.

- ⇒ **Spaink HP.** (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125-130.
- ⇒ **Spaink HP.** (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Re. Microbiol.* 54:257–288.
- ⇒ **Sprent J. & Sprent P.** (1990). Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, 266.
- ⇒ **Sprent, J. I. & James, E. K.** (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol.* 144(2):575-81.
- ⇒ **Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ.** (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141:1473-81.
- ⇒ **Stacey G; Luka S; Sanjuan J; Banfalvi Z; Nieuwkoop A J; Chun J Y; Forsberg L S; Carlson.R.**(1994) nodZ, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology* 176(3): 620-33.
- ⇒ **Stachelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Mellor, R., Boller, T. & Kondorosi, A.** (1994). Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* 5:319-330.
- ⇒ **Stachelin, C., Schultze, M., Tocuyaso, K., Poinso, V., Prome, J-C., Kondorosi, E. & Kondorosi, A.** (2000). N-deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13:72-79.
- ⇒ **Starker CG, Parra-Colmenares AL, Smith L, Mitra RM, Long SR.** (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Physiol.* 140(2):671-80.
- ⇒ **Starker, C.G., Parra-Colmenares, A.L., Smith, L., Mitra, R.M., and Long, S.R.** (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Physiol.* 140: 671–680.
- ⇒ **Stow JL.** (1995). Regulation of vesicular transport by GTP-binding proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 4(5):421-5.
- ⇒ **Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962.

- ⇒ **Streit W.; Kosch K.; Werner D.** (1992). Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (*gus*) gene fusion. *Biol. Fertil. Soils*. 14: 140–144.
- ⇒ **Südhof TC & Rizo J** (1996). Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 17:379-388.
- ⇒ **Summers, M.L., Botero, L.M., Busse, S.C. & McDermott, T.R.** (2000). The *Sinorhizobium meliloti* *lon* protease is involved in regulating exopolysaccharide synthesis and is required for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol* 182: 2551-2558.
- ⇒ **Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM.** (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal* 46: 961–970.
- ⇒ **Surpin M., Raikhel N.** (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 100–109.
- ⇒ **Sutton, W. D. & A. D. Paterson.** (1980). Effects of host plant on the detergent sensitivity and viability of *Rhizobium* bacteroids. *Planta* 148: 287–292.
- ⇒ **Sutton, W. D. & A. D. Paterson.** (1983). Further evidence for a host plant effect on *Rhizobium* bacteroid viability. *Plant Sci. Lett.* 30:33–41.
- ⇒ **Suzuki A, Hara H, Kinoue T, Abe M, Uchiumi T, Kucho K, Higashi S, Hirsch AM, Arima S.** (2008). *J Plant Res*, 121(2):245-9.
- ⇒ **Swaraj, K. & N. R. Bishnoi.** (1996). Physiological and biochemical basis of nodule senescence in legumes: a review. *Plant Physiol. Biochem.* 23: 105-116.
- ⇒ **Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P. & Zamore, P. D.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development* 17: 49-63.
- ⇒ **Tansengco ML, Hayashi M, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y.** (2003). crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131(3):1054-63.
- ⇒ **Tausczik Y.** (2006). An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume–rhizobium interaction. *Proc. R. Soc. B* 273: 77–81.
- ⇒ **Tepfer D., Goldmann A., Fleury V., Maille M., Message B. Pamboukdjian N., Boivin C., Dénarié J., Rosenberg G., Lallemond JY., Descoins C., Charpin I., Amarger N.** (1988). Calystegins nutritional mediators in plant-microbe interactions. N: Palacios R., Verma DP. (eds) *Molecular Genetics of plant-microbe interactions*. 139-144.

- ⇒ **Terada, R., Ignacimuthu, S., Bauer, P., Kondorosi, E., Schultze, M., Kondorosi, A., Potrykus, I. & Sautter, C.** (2001). Expression of early nodulin promoter gene in transgenic rice. *Current Science*, 81: 270-276.
- ⇒ **Timmers, A. C. J., Auriac, M. C., and Truchet, G.** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126: 3617-3628.
- ⇒ **Tirichine L, James EK, Sandal N, Stougaard J** (2006) Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 373.
- ⇒ **Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrektsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*: 315:104-107.
- ⇒ **Tohme M., J., González, D. O., Beebe, S. and Duque, M. C.** (1996). AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sc.* 36(5):1375-1384.
- ⇒ **Trahey M, Wong G, Halenbeck R, Rubinfeld B, Martin GA, Ladner M, Long CM, Crosier WJ, Watt K, Koths K, et al.** (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science.* 23;242(4886):1697–1700
- ⇒ **Tsien, H. C., P. S. Cain & E. L. Schmidt** (1977). Viability of *Rhizobium* bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:854–856.
- ⇒ Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.*, 14, S153164.
- ⇒ **van Batenburg, FHD., Jonker, R., Kijne, JW.** (1986). *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiologia Plantarum.* 66: 476–480.
- ⇒ **van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J. & Kijne, J.W.** (1992). Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70-72.
- ⇒ **Van de Velde W., Pérez Guerra JC., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. & Goormachtig S.** (2006). Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology.* 141: 711-720.

- ⇒ **Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z.** (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327: 1122- 1126.
- ⇒ **van de Wiel C, Scheres B, Franssen H, van Lierop MJ, van Lammeren A, van Kammen A, Bisseling T.** (1990). The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9 (1):1–7.
- ⇒ **Van Kammen, A.** (1995). The molecular development of nitrogen fixing root nodules. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation. St. Petersburg, Russia. 9
- ⇒ **Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J.** (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* 59, 124–142.
- ⇒ **Vance, C. P., P. H. Reibach & W. R. Ellis.** (1986). Proteolytic enzymes of legume nodules and their possible role during nodule senescence. pp. 103-124. In: M. J. Dalling (ed.). *Plant proteolytic enzymes*. Vol. 2. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- ⇒ **Vance, C., Graham, P. & Allan, D.** (2000). Biological Nitrogen Fixation: Phosphorus - A Critical Future Need? In: Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Pedrosa, FO., Hungria, M., Yates, MG., y Newton, WE., (eds). Kluwer Academic publisher, Dordrecht. The Netherlands. 509-514.
- ⇒ **Vanechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G.** (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *zyzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 2):317-27.
- ⇒ **Varkonyi-Gasic, E. & White, D. W. R.** (2002). The white clover *ENOD40* gene family. Expression patterns of two types of genes indicate a role in vascular function. *Plant Physiol.*, 129: 1107-1118.
- ⇒ **Vazquez, M., Davalos A., De Las Penas A., Sanchez F. y Quinto, C.** (1991). Novel Organization of the Common Nodulation Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Strains. *Journal of Bacteriology* 1250-1258.
- ⇒ **Veereshlingam H, Haynes JG, Penmetsa RV, Cook DR, Sherrier DJ, Dickstein R.** (2004). *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. *Plant Physiol*, 136(3):3692-702.

- ⇒ **Velásquez, V. L. & Gepts, P.** (1994). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37: 256–263.
- ⇒ **Vincent, J.M.** (1982). Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sydney. 288 p.
- ⇒ **Wang D., Griffiths J., Starker C., Federova E., Limpens E., Ivanov S., Bisseling T. & Long S.** (2010). A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science* 327: 1126-1129.
- ⇒ **Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC** (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593–598.
- ⇒ **Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U** (2006) Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*, 18: 1617.
- ⇒ **Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O.** (2006). The wound responses in tomato-Role of jasmonic acid. *J Plant Physiol*, 163: 297-306.
- ⇒ **Wasternack C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100: 681–697.
- ⇒ **Watanabe N., Lam E.** (2006). Arabidopsis BAXinhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45: 884–94.
- ⇒ **Watanabe N., Lam E.** (2008). BAXinhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 283: 3200-10.
- ⇒ **Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A, Downie JA.** (2008). Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J Bacteriol.* 190(13):4706-15.
- ⇒ **Wilson RC, Long F, Maruoka EM, Cooper JB.** (1994). A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell*, 6(9):1265-75.
- ⇒ **Xu C., Xu W., Palmer AE., y Reed JC.** (2008). BI-1 Regulates Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Homeostasis Downstream of Bcl-2 Family Proteins. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL.* 283(17): 11477–11484.
- ⇒ **Yang WC, Katinakis P, Hendriks P, Smolders A, de Vries F, Spee J, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H.** (1993). Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* 3:573–585.

- ⇒ **Yang, W. C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A.** (1994). *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell*, 6:1415-1426.
- ⇒ **Yano Ja, Hayashi M, Parniske M, Wang TL, Downie JA** (2006). Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth. *Mol Plant Microbe Interact* 19 (0).
- ⇒ **Young, JPW. & Haukka, K.**(1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *J. Phytol.* 133:87.
- ⇒ **Young, JPW. & Johnston, A.W.B.** (1989). The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 4:341.
- ⇒ **Young, JPW.** (1992) Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. In: Biological Fixation. Stacey, G., Burris, H.R. & Evans, H.J. (eds.). Chapman and Hall, New York. 43-79.
- ⇒ **Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.
- ⇒ **Zanetti ME, Blanco F, Beker P, Battaglia M, Aguilar OM.** (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell*, aceptado.
- ⇒ **Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, & Bailey-Serres J.** (2005). Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* 138 (2): 624-635.
- ⇒ **Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Südhof, T. C. & Anderson, R. G. W.** (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell* 78, 751–760.
- ⇒ **Zhu C, Gan L, Shen Z, Xia K** (2006) Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in Arabidopsis. *J Exp Bot* 57: 1299–1308
- ⇒ **Zhukov, V., Radutoiu, S., Madsen, L.H., Rychagova, T., Ovchinnikova, E., Borisov, A.** (2008). The pea sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1600-1608.