

Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular

Caracterización fenotípica de plantas de *Medicago truncatula* con niveles reducidos de *Rop2*



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
La Plata, 2019

Inés Harguindeguy

Caracterización fenotípica de plantas de *Medicago truncatula* con niveles reducidos de *Rop2*

Autor: Inés Harguindeguy

Director: Dr. Flavio Antonio Blanco

Tutor: Lic. Claudio Rivero

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología y Biología
Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad
Nacional de La Plata, CCT-La Plata, CONICET

Agradecimientos

A mis papás, Jorge y Silvia, por haberme dado la oportunidad de estudiar esta carrera y por su apoyo incondicional a lo largo de estos años. Gracias por estar siempre presentes para escucharme y por enseñarme la importancia del trabajo y la perseverancia. Gracias por su honestidad, su dedicación, y el amor con el que me criaron. A Clara y Juan, por ser los mejores hermanos que alguien puede tener.

A Flavio y Euge, por darme un lugar en su laboratorio y por el apoyo para formarme como profesional y como persona. Gracias por permitirme formar parte de un grupo de trabajo increíble en el cual me sentí cómoda e integrada desde el primer momento.

A Claudio, mi tutor, por la dedicación, el tiempo y la paciencia para enseñarme a trabajar en el laboratorio y formarme profesionalmente.

A todos los integrantes de R4, Cris, Caro, Sole, Carla, Mili, Agus, Mauri y Marcos, por tratarme como una más desde el primer día y por estar siempre dispuestos a ayudarme cada vez que lo necesité.

A la Universidad Nacional de La Plata, por haberme brindado educación de calidad. A todas las personas que conforman el IBBM.

A los amigos que me dio la facultad, Euge, Flor, Vicky, Coti, Caro, Barbi, Marqui y Chaco, gracias por todos estos años de estudio, cenas, juntadas y miles de momentos compartidos. A mis amigas de América, que a pesar que tomamos caminos diferentes siempre están presentes.

A Ramiro, mi novio, por su compañía y apoyo a lo largo de todos estos años. Gracias por todos los buenos momentos, e intentar que los malos no lo sean tanto. Y a su familia, por tratarme como a una más de ellos y estar siempre presentes.

Índice

Introducción	6
1. Importancia del nitrógeno en la agricultura	7
1.1 Fertilización química	7
1.2 Fijación biológica de nitrógeno.....	8
2. Plantas leguminosas	9
3. <i>Medicago truncatula</i> como planta modelo en el estudio de leguminosas .	11
4. Asociación simbiótica rizobio-leguminosa.....	12
4.1 Mecanismo de infección rizobiana y organogénesis del nódulo	13
4.2. Vías de señalización de la nodulación	15
5. Las GTPasas monoméricas y su rol en la nodulación	17
6. GTPasas de la familia ROP	19
Objetivos	24
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos	25
Materiales y métodos	26
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	27
1.1 Medio de crecimiento	27
1.2 Esterilización superficial y germinación de semillas	29
1.3 Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> mediante <i>A. rhizogenes</i>	29
1.4 Inoculación de raíces con <i>S. meliloti</i>	30
1.5 Tratamiento de raíces con auxina exógena	31
1.6 Recolección de tejido	31
1.7 Cinética de nodulación	31
2. Cepas bacterianas utilizadas	32
2.1 Condiciones de cultivo	32
2.2 Medios de cultivo	33

2.3 Antibióticos.....	33
2.4 Transformación de células de <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> electrocompetentes	34
2.5 Glicerol stocks.....	34
3. Técnicas de biología molecular.....	35
3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.2 Electroforesis en geles de agarosa.....	37
3.3 Minipreparación de ADN plasmídico.....	38
3.4 Digestión enzimática del ADN.....	38
3.5 Construcción de vectores mediante el sistema de clonado GATEWAY	38
3.6 Extracción de ARN.....	39
3.7 Cuantificación del ARN	40
3.8 Tratamiento de las muestras de ARN con DNAsa	40
3.9 Síntesis de cDNA.....	40
3.10 Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR)	41
Resultados y discusión	42
Sección 1	
1. Generación de la construcción para el silenciamiento del transcrito <i>ROP2</i> por RNA de interferencia.....	43
2. Generación de plantas compuestas con niveles reducidos del transcrito <i>ROP2</i>	55
3. Análisis del fenotipo asociado a la nodulación de las plantas RNAi- <i>ROP2</i>	56
Sección 2	
1. Análisis del patrón de expresión de <i>Rop2</i> en diferentes órganos y condiciones.....	59
Conclusiones y perspectivas	65
Material suplementario	68
Bibliografía.....	70

Introducción

1. Importancia del nitrógeno en la agricultura

El nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales en la nutrición de todos los seres vivos, ya que se encuentra en la composición química de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares. Aproximadamente el 78 % del aire atmosférico está compuesto por nitrógeno en su forma molecular (N_2), pero a pesar de ser un elemento tan abundante en la atmósfera, la mayoría de los organismos no pueden asimilar el nitrógeno en dicha forma, ya que se requiere una alta energía de activación para hidrolizar el triple enlace covalente presente en la molécula (Canfield, Glazer, and Falkowski 2010).

Las plantas solamente pueden incorporar a su metabolismo nitrógeno en forma de nitratos (NO_3^-) y de amonios (NH_4^+). A su vez, estas formas de nitrógeno se encuentran en concentraciones muy bajas en muchos suelos cultivables y constituyen, después del agua, el principal factor limitante del crecimiento y desarrollo vegetal.

1.1 Fertilización química

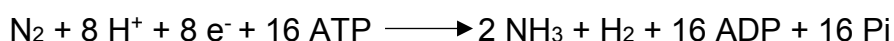
En los sistemas de importancia agronómica, la falta de nitrógeno en el suelo es suplida mediante la adición de fertilizantes químicos, con el fin de aumentar la productividad de las cosechas. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fertilizantes nitrogenados ha traído aparejadas graves consecuencias ambientales, ya que parte del amonio utilizado en los cultivos percola en la tierra causando la contaminación de las fuentes subterráneas de agua. La posterior contaminación de ecosistemas acuáticos puede llevar a la eutrofización de ríos y lagos, es decir, el crecimiento en exceso de algas en la superficie que agotan el oxígeno necesario para otras especies, con la consecuente pérdida de biodiversidad (Graham and Vance 2003). Además, la acumulación de nitratos en el agua puede alcanzar niveles tóxicos que representen una amenaza para la salud humana. Por otro lado, la emisión de gases nitrogenados a la atmósfera contribuye al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida (Robertson and Vitousek 2009). La producción de fertilizantes nitrogenados se basa en el proceso industrial conocido como Haber-Bosh, el

cual permite la producción de amonio (NH_3^+) a partir de la reacción entre hidrógeno y nitrógeno molecular ($\text{N}_2 + 3 \text{H}_2 \rightarrow 2 \text{NH}_3^+$). Esta reacción genera un enorme consumo de combustibles fósiles, contribuyendo también al aumento global de la temperatura. Todos estos efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana plantean la necesidad de implementar estrategias alternativas de fertilización que contribuyan con la implementación de prácticas agrícolas sustentables.

1.2 Fijación biológica de nitrógeno

Debido al alto costo energético de la reacción, tan sólo un pequeño grupo de bacterias y arqueobacterias tienen la capacidad de reducir el N_2 a formas que puedan ser asimiladas por el metabolismo, como el amonio (NH_4^+), a través de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Las bacterias nitrificantes luego son capaces de convertir el amonio en nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Estas formas inorgánicas, en las que el nitrógeno puede ser asimilado por la mayoría de los seres vivos, se encuentran en muy baja proporción en los suelos y constituyen un factor limitante en la producción agrícola.

Entre los microorganismos que pueden llevar a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico se incluyen organismos acuáticos, bacterias de vida libre y bacterias que establecen simbiosis con leguminosas. Los microorganismos fijadores de nitrógenos poseen un complejo enzimático denominado nitrogenasa, el cual cataliza la reducción del nitrógeno (N_2) llevándolo a amoníaco (NH_3) mediante la siguiente reacción:



Este complejo enzimático es fácilmente inhibido en presencia de oxígeno, por lo que la reducción del N_2 mediante la FBN ocurre en ambientes anaerobios o microanaerobios (Zumft and Mortenson 1975).

Dentro del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, la FBN contribuye en un 60 % a la incorporación del nitrógeno a los suelos, mientras que la industria de los fertilizantes contribuye en un 25 % y las radiaciones ultravioletas en un 10 % (Robertson and Vitousek 2009). Estos valores muestran la importancia de la FBN

en los ecosistemas naturales y agronómicos, y ponen en evidencia el alto potencial biotecnológico que este proceso puede tener en la agricultura.

En la actualidad, uno de los principales objetivos de la biotecnología vegetal es desarrollar variedades de cultivos de importancia agronómica con mayores rendimientos, y al mismo tiempo reducir el impacto negativo en el medio ambiente que ocurre como consecuencia de las prácticas agrícolas modernas, como es el uso de fertilizantes nitrogenados. En este contexto, la FBN, proporciona una herramienta para incrementar los rendimientos de los cultivos, y a la vez constituye una alternativa de fertilización más económica y segura para el medio ambiente. Al mismo tiempo, disminuye significativamente el consumo de residuos fósiles requeridos para la síntesis de nitrato o amonio y, consecuentemente, reduce no sólo el gasto de producción de fertilizantes sintetizados químicamente, sino también la contaminación y el daño ambiental que conlleva su abuso.

2. Plantas leguminosas

Las fabáceas (*Fabaceae*), también conocidas comúnmente como leguminosas (*Leguminosae*), constituyen la tercera familia más grande de plantas superiores del planeta. Esta familia posee alrededor de 20.000 especies, incluyendo algunas de gran interés económico y agronómico a nivel mundial (Gepts et al. 2005). Entre ellas se encuentran la soja (*Glycine max*), una de las leguminosas de mayor consumo utilizada tanto para la alimentación humana como animal, la arveja (*Pisum sativum*), la cual es cultivada para la obtención de granos destinados al consumo humano, y el poroto (*Phaseolus vulgaris*), el cual constituye la fuente primaria de la dieta proteica en muchos países en vías de desarrollo. Por otro lado, la alfalfa (*Medicago sativa*) y diferentes especies de tréboles (*Medicago hispida*, *Melilotus alba*, entre otras) son utilizadas como plantas forrajeras (Figura 1).

Como alimento, las leguminosas de grano son una fuente importante de nutrientes, tanto en la dieta humana como animal. Las legumbres se destacan por poseer un alto contenido proteico, con semillas que contienen un 20-30 % p/p de proteína. También son una fuente importante de hidratos de carbono, con

valores que oscilan entre el 56 y el 58 % p/p. El aporte de grasa es del 1 al 1,6 %, y además son una buena fuente de calcio, hierro y fósforo (Graham and Vance 2003).



Figura 1. Plantas leguminosas de importancia agronómica utilizadas para la alimentación humana y animal (*G. max*, *P. vulgaris*, *P. sativum*) o como forrajeras (*M. sativa*).

Las plantas leguminosas, además de poseer varias especies de gran importancia comercial, se caracterizan por su capacidad de establecer una asociación simbiótica fijadora de nitrógeno con bacterias del suelo denominadas rizobios. Como resultado de esta interacción se produce la FBN, ya que estas bacterias poseen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en formas que pueden ser asimiladas fácilmente por el metabolismo de la planta. Esta asociación mutualista provee a la bacteria un nicho apropiado para la fijación de nitrógeno y compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis, mientras que beneficia a la planta con una fuente de nitrógeno reducido, el cual resulta esencial para el crecimiento y desarrollo de la misma.

Debido a esta capacidad de asociarse simbióticamente a los rizobios, las leguminosas se presentan como una alternativa atractiva, de bajo costo y sustentable a la fertilización química en los sistemas agrícolas, aumentando el contenido de nitrógeno en el suelo y disminuyendo el daño ambiental causado por la utilización de fertilizantes, beneficiando así el crecimiento de las siguientes

plantaciones y la recuperación de suelos en programas de rotación de cultivos (Gruber and Galloway 2008).

La interacción simbiótica entre las leguminosas y las bacterias rizobiales representa una porción significativa de la fijación biológica de nitrógeno en todo el mundo. Alrededor de 21 toneladas de nitrógeno son fijadas anualmente a partir de esta interacción, de las cuales entre 5 y 7 toneladas son incorporadas a los suelos, reduciendo en aproximadamente 10 mil millones de dólares el costo de la fertilización (Charpentier and Oldroyd, 2010; Foyer et al., 2016).

3. *Medicago truncatula* como planta modelo en el estudio de leguminosas

Las ventajas de destinar los recursos de investigación hacia una sola especie se hacen evidentes al considerar el éxito de *Arabidopsis thaliana* como modelo para el estudio del crecimiento y desarrollo de las plantas. Teniendo en cuenta que esta especie no es capaz de fijar nitrógeno a través de la simbiosis, la comunidad científica internacional estableció a la leguminosa *M. truncatula* como sistema modelo para el estudio de la biología de las leguminosas y la simbiosis entre plantas y microorganismos, lo que generó el rápido avance en el descubrimiento y caracterización de los genes involucrados en el proceso de nodulación y las vías de señalización activadas en la planta en respuesta al rizobio (Imin et al. 2008).

Medicago truncatula (Figura 2) fue seleccionada como modelo de investigación debido a sus características biológicas y su fácil manipulación en el laboratorio. Esta especie posee numerosas características relevantes tales como un genoma diploide pequeño (470-550 Mpb) que ha sido secuenciado recientemente (Pecrix et al. 2018; Young et al. 2011), un ciclo de vida corto (3-4 meses), una alta producción de semillas y la posibilidad de reproducirse por autofertilización. Además, posee un tamaño relativamente pequeño, lo que permite cultivar un alto número de plantas en un espacio reducido. Por otro lado, su simbionte *Sinorhizobium meliloti* ha sido estudiado en profundidad y su genoma ha sido secuenciado completamente (Galibert et al. 2001). Cabe mencionar también que la asociación simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti* ha sido caracterizada a nivel fisiológico, morfológico y molecular (Oldroyd 2013).



Figura 2. *Medicago truncatula*, leguminosa modelo utilizada en el presente trabajo.

Considerando el rol central de *M. truncatula* en la investigación de las interacciones leguminosa-rizobio, se han desarrollado diversas técnicas que sirven como herramientas genéticas y moleculares para el estudio de la biología del proceso de nodulación, entre las cuales se destacan datos de expresión de distintos órganos y estadios de desarrollo (Benedito et al. 2008), bancos de mutantes de TILLING (<http://revgenuk.jic.ac.uk/TILLING.htm>) o de inserciones del transposón de tabaco Tnt1 (Pislariu et al. 2012). A su vez, se han desarrollado métodos para la transformación estable de *M. truncatula* con *Agrobacterium tumefaciens*, y también métodos de generación de plantas compuestas, las cuales presentan raíces transgénicas y mantienen la parte aérea salvaje, mediante la transformación mediada por *A. rhizogenes* (Boisson-Dernier et al. 2001).

4. Asociación simbiótica rizobio-leguminosa

Como se mencionó anteriormente, las leguminosas poseen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias del suelo conocidas como rizobios (Foyer et al. 2016). Esta interacción se inicia en la rizósfera e involucra un intercambio de señales químicas, donde moléculas producidas por cada uno de los simbioses inducen, en forma secuencial y ordenada, la activación de genes que conducen a la formación de un nuevo órgano especializado en la raíz de la planta, denominado nódulo (Figura 3), dentro del cual los rizobios se alojan y son capaces de llevar a cabo la FBN.

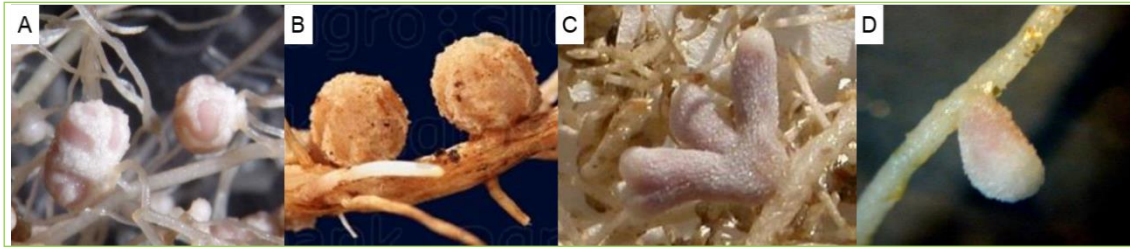


Figura 3. Nódulos en distintas leguminosas. A) *Phaseolus vulgaris*. B) Soja. C) *Medicago truncatula*. D) Alfalfa.

4.1 Mecanismo de infección rizobiana y organogénesis del nódulo

El establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rizobios y la formación del nódulo son procesos complejos que se dan en etapas sucesivas y coordinadas. Cuando las leguminosas crecen en suelos que presentan condiciones de nitrógeno limitantes, ocurre un intercambio de señales químicas entre la raíz de la planta y los rizobios compatibles presentes en la rizósfera, el cual permite el reconocimiento mutuo entre ambos simbioses. Los flavonoides exudados por la raíz de la planta actúan como quimioattractantes de las bacterias (Perret, Staehelin, and Broughton 2000), a la vez que activan la expresión de un conjunto de genes de nodulación del rizobio. Los productos de estos genes bacterianos participan en la síntesis y liberación de una molécula de naturaleza quitolipooligosacáridica, conocida como factor de nodulación o factor Nod, que a su vez actúa como molécula de señalización sobre la planta (Oldroyd and Downie 2008). Los factores Nod son reconocidos por las células de la raíz de la planta a través de receptores de tipo quinasa, y actúan principalmente en dos tipos de células de la raíz, células epidérmicas y células corticales, provocando cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares que llevan, en última instancia, a la infección rizobiana y la formación del nódulo radical (Geurts, Fedorova, and Bisseling 2005; Relić et al. 1994).

Luego del intercambio de señales químicas y la percepción del factor Nod, la adhesión del rizobio a las células de los pelos radicales es el primer paso en la asociación de la bacteria con la planta hospedante (Figura 4A). La secreción de factor Nod produce un cambio en el eje de crecimiento del pelo radical, generando que éste se curve y forme un rulo alrededor de la microcolonia bacteriana (Figura 4B), dando lugar así a un foco de infección. Se produce

entonces la degradación de la pared celular vegetal, la invaginación de la membrana plasmática, y se inicia la formación de una estructura tubular hueca denominada hilo de infección (Figura 4C). El rizobio penetra y se divide dentro del hilo de infección, el cual subsecuentemente transvasa el pelo radical y las células corticales, ramificándose hasta alcanzar las células internas de la raíz para infectarlas (Oldroyd et al. 2011). En paralelo con estos cambios en la epidermis, las células corticales que se encuentran debajo de los sitios de infección comienzan a dividirse para producir el primordio del nódulo (Kondorosi and Kondorosi 2004). El hilo de infección crece hacia el primordio, donde se produce la liberación de las bacterias en el interior de las células corticales. Allí, las bacterias que logran invadir las células corticales de la raíz se diferencian a bacteroides, quedando rodeadas de una membrana que deriva de la membrana plasmática de la planta (Roth and Stacey 1989). El resultado es un nuevo órgano en la raíz de la planta que contiene estructuras subcelulares semejantes a organelas, denominadas simbiosomas, donde luego los bacteroides llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Figura 4D) (Oldroyd and Downie 2008).

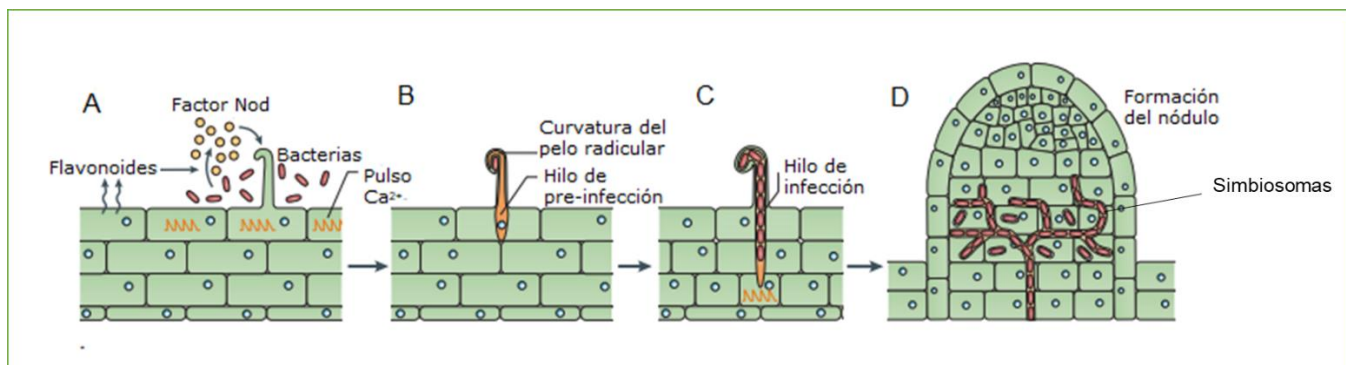


Figura 4. Proceso de infección y formación del nódulo. La nodulación involucra el desarrollo coordinado de la infección bacteriana con la organogénesis del nódulo. A) Intercambio de señales químicas entre rizobios y la raíz de la planta. Las bacterias se adhieren a la superficie del pelo radical en crecimiento. Cuando hay una baja concentración de nitrógeno en el suelo, la planta secreta flavonoides que son percibidos por las bacterias, generando la producción y liberación del factor de nodulación. Esta molécula genera cambios moleculares en las células epidérmicas, tales como el pulso de Ca^{+2} (*calcium spiking*). B) La percepción del rizobio desencadena el curvado del pelo radical por un cambio en la dirección del crecimiento polar, que rodea a la microcolonia bacteriana. C) La membrana plasmática vegetal se invagina formando una estructura tubular, el hilo de infección. D) La reactivación del ciclo celular genera divisiones corticales que dan lugar al nódulo. El hilo de infección se ramifica y cuando alcanza las células del primordio del nódulo se produce la formación del simbiosoma. Adaptado de Oldroyd 2013.

Si bien la formación del nódulo y del hilo de infección son dos procesos fisiológicos diferentes e independientes que suceden en el córtex y en la epidermis, respectivamente, están coordinados de tal manera que el primordio del nódulo se forma cerca del sitio de infección bacteriana (Oldroyd and Downie 2008). El estudio de mutantes deficientes en la nodulación ha revelado que las respuestas que ocurren en la epidermis pueden ser separadas de las que ocurren en el córtex, ya que la infección bacteriana puede ocurrir sin la formación del nódulo (Oldroyd et al. 2011) y por el otro lado la formación del nódulo puede ocurrir en ausencia de infección bacteriana (Tirichine et al. 2006).

4.2 Vías de señalización de la nodulación

Como se mencionó anteriormente, el proceso de infección bacteriana comienza cuando los factores Nod son reconocidos por receptores presentes en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz. Estos son receptores de tipo quinasa con dominios extracelulares LysM (motivos de lisina). En la leguminosa *M. truncatula* se han identificado dos receptores de este tipo, denominados LYK3 (*LysM Receptor Like Kinase 3*) y NFP (*Nod Factor Perception*) (Limpens and Bisseling 2003; Radutoiu et al. 2003).

La percepción del factor Nod activa una cascada de transducción de señales que involucra otro receptor de tipo quinasa con un dominio extracelular rico en leucina (LRR), denominado DMI2 (*does not make infection 2*) (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002), dando lugar a la activación de las oscilaciones de la concentración de calcio dentro y alrededor del núcleo, conocidas como *calcium spiking* (Ehrhardt, Wais, and Long 1996; Sieberer et al. 2009). Estas oscilaciones actúan como mensajeros secundarios que transmiten la señal hacia el núcleo, donde son decodificadas por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina de localización nuclear (CCaMK), denominada DMI3 (*does not make infection 3*) en *M. truncatula* (Gleason et al. 2006). DMI3 fosforila e interacciona físicamente con la proteína IPD3 (Messinese et al. 2007), un factor de transcripción que activa la transcripción del gen *Nodule Inception* (NIN) y de los factores de transcripción NSP1 y NSP2 (*Nodulation Signaling Pathway 1 y 2*).

NIN es un factor de transcripción que actúa como un regulador central de la nodulación (Singh et al. 2014), iniciando la activación de otros factores de transcripción, entre los que se encuentran los factores nucleares NF-Y (Baudin et al. 2015; Zanetti et al. 2010). En el córtex, NIN promueve la expresión de la respuesta a citoquinina del receptor de citoquinina CRE1 (Vernié et al. 2015). A su vez, las factores de transcripción NSP1 y NSP2 producen la activación de NIN, y participan en la inducción de la expresión de genes de nodulación temprana (ENODs por *early nodulins*), dando lugar a la reprogramación de la expresión génica de las células de la raíz (Cerri et al. 2012; Lee, Lum, and Hirsch 2007) (Figura 5).

Estudios recientes han demostrado que la interacción física entre el dominio intracelular con actividad quinasa del receptor NFP y la GTPasa monomérica ROP10 de *M. truncatula* es requerida para la deformación del pelo radical inducida por el factor Nod durante la infección rizobiana (Lei et al. 2015) (Figura 5). Este resultado establece un vínculo importante entre la señalización iniciada por la percepción del factor Nod y las proteínas que forman parte de la superfamilia de GTPasas monoméricas.

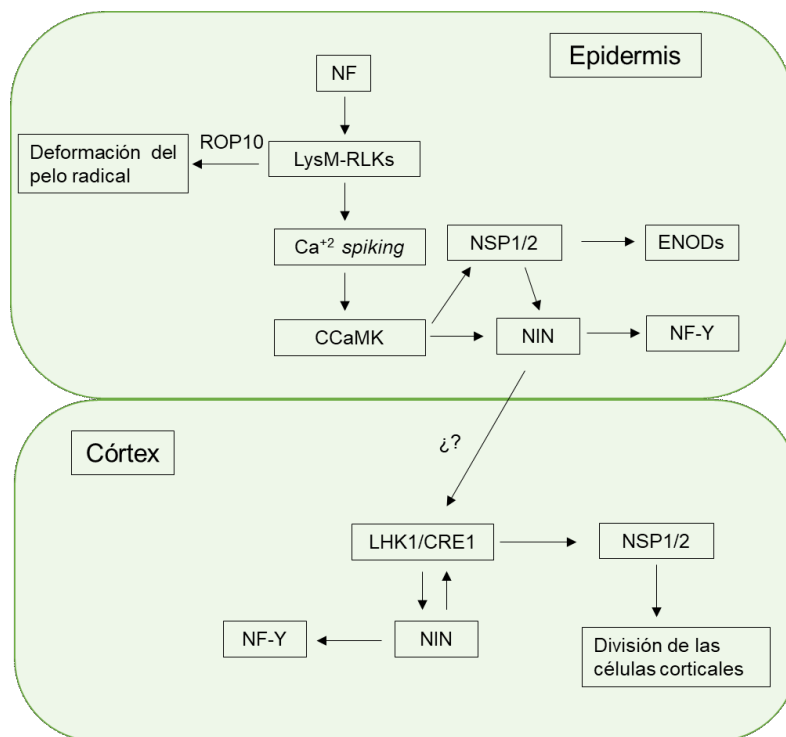


Figura 5. Vía de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios. La percepción de los factores Nod (NF) a través de receptores tipo quinasa con dominio LysM

(LysM-RLKs) inicia los cambios morfológicos y fisiológicos asociados a la infección y a la formación del nódulo. El sistema de transducción de la señal incluye la activación del Ca^{+2} *spiking* y la posterior inducción de los genes de nodulación temprana (ENODs), siendo requeridas proteínas de señalización, como la quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK) y factores de transcripción (NSP1/2 y NIN). Las hormonas vegetales también cumplen un rol en la regulación de la nodulación, siendo importantes en la inducción de genes relacionados con la formación del nódulo en el córtex. Las citoquininas son percibidas por el receptor LHK1 (Lotus Histidine Kinase), induciendo la división de las células corticales. Figura adaptada de Oldroyd and Downie 2008.

5. Las GTPasas monoméricas y su rol en la nodulación

Las GTPasa monoméricas están presentes en los genomas de todos los organismos eucariontes, desde levaduras hasta mamíferos y plantas, siendo una de las familias génicas más importantes en la regulación de una enorme cantidad de procesos celulares. Estas proteínas han sido implicadas en la modulación de las respuestas disparadas por la percepción de señales mediada por receptores, el tráfico intracelular mediado por vesículas, los rearrreglos del citoesqueleto en respuesta a cambios ambientales y el tráfico nuclear (Pereira-Leal and Seabra 2001; Takai, Sasaki, and Matozaki 2001).

La superfamilia de GTPasas monoméricas, también conocidas como pequeñas GTPasas, se subdivide en 5 familias en levaduras y animales: Rab, Ras, Arf, Rho y Ran, mientras que en plantas sólo hay 4, ya que no se han encontrado genes con alto grado de homología a Ras en los genomas vegetales (Vernoud et al. 2003).

Las GTPasas monoméricas actúan como un interruptor molecular que activa y desactiva vías de señalización intracelular al alternar entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo en unión a GDP. La activación es regulada por factores de intercambio de guanina (GEFs, por *Guanine Exchange Factors*), que catalizan el intercambio de GDP a GTP, mientras que la inactivación depende de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs, por *GTPase Activating Proteins*), que aumentan la velocidad de hidrólisis de GTP a GDP, y de los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), que inhiben el intercambio de GDP por GTP y mantienen a las GTPasas en un estado inactivo en el citosol (Figura 6). Además, su localización subcelular se modifica

mediante la unión covalente a lípidos que regulan su asociación transitoria y reversible a distintos tipos de membranas (Rivero et al. 2019). En su estado activo, las GTPasas monoméricas poseen capacidad intrínseca de hidrólisis de GTP y pueden interactuar con diversos efectores que modulan su actividad y localización.

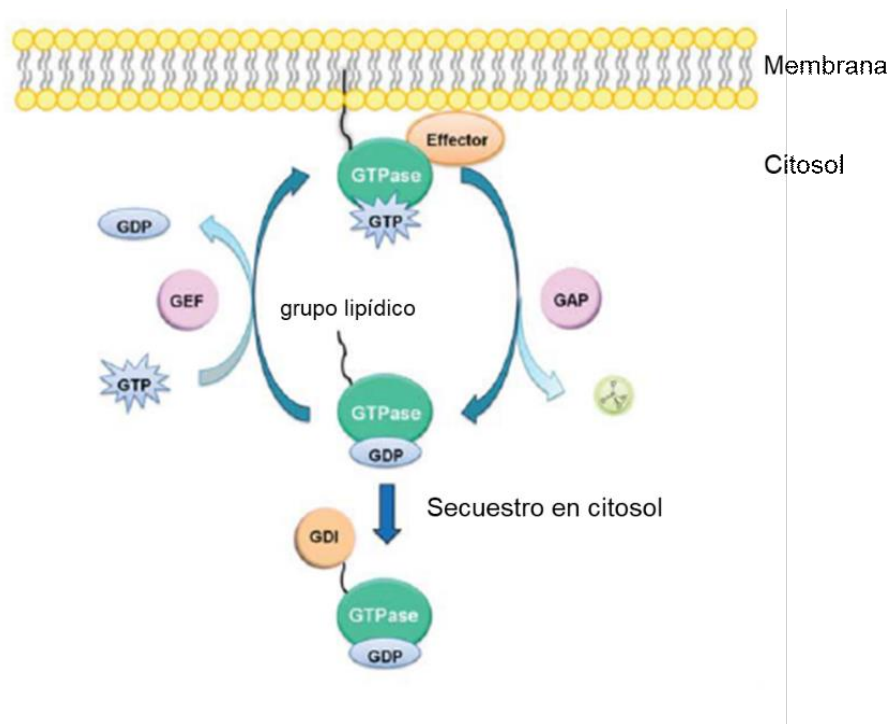


Figura 6. Modelo del mecanismo de activación e inactivación de las GTPasas monoméricas. Las GTPasas monoméricas alternan entre un estado activo, unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. La activación e inactivación cíclica se encuentra regulada por la acción de proteínas accesorias: las proteínas GEFs, que catalizan el intercambio de GDP por GTP, las proteínas GAPs, que incrementan la velocidad de hidrólisis de GTP a GDP, y los GDIs, que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo a las GTPasas inactivas en el citosol. Las GTPasas pueden interactuar con sus efectores de manera tal que modulan su actividad dentro de la célula. Las pequeñas GTPasas se asocian a membranas (con la excepción de las GTPasas Ran) a través de modificaciones post-traduccionales que generan uniones covalentes con lípidos (prenilación). La localización en membranas y la unión a GTP son necesarias para la interacción de GTPasas monoméricas con efectores específicos que activan las vías de señalización aguas abajo. Figura extraída de Rivero et al. 2019.

Estudios realizados en los últimos años han mostrado que las GTPasas monoméricas desempeñan funciones esenciales durante las etapas tempranas de la nodulación (Blanco et al. 2009; Limpens et al. 2009). Las mismas forman

parte de los mecanismos de crecimiento polar involucrados en el crecimiento del pelo radical, así como en los eventos que ocurren en respuesta al rizobio: cambio del eje de crecimiento y formación del hilo de infección (Tan et al. 2002).

6. GTPasas de la familia ROP

Las plantas poseen una familia génica con características propias y cierta similitud a la familia de GTPasas Rho en animales, por lo que se las conoce como ROP, por *Rho of Plants*. La evidencia acumulada a partir de diversos estudios ha demostrado que las GTPasas de tipo ROP ejercen su función principalmente controlando la dinámica del citoesqueleto, regulando el ensamblado de fibras de actina para formar redes y haces y la dinámica de los microtúbulos corticales (Yalovsky 2015). Estas GTPasas participan en la simbiosis al regular la infección rizobiana y la nodulación (Ke et al. 2012; Kiirika et al. 2012).

El estudio de las proteínas ROP en distintas especies de plantas, tales como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *L. japonicus* demostró que estas GTPasas comparten características estructurales altamente conservadas (Liu et al. 2010). Las ROPs de *M. truncatula* (MtROP) contienen siete dominios funcionales. Los dominios GTPasa (I y III), los dominios de unión a GDP/GTP (IV y VI) y el dominio efector (II) se encuentran altamente conservados; sin embargo, la región de inserción (V) y la región hipervariable (VII o HVR) son mucho más diversas (Zheng and Yang 2000) (Figura 7).

De acuerdo a la característica estructural del extremo C-terminal, las proteínas ROP fueron categorizadas en dos tipos: aquellas proteínas que contiene el motivo CAAL (C: cisteína, L: leucina, A: aminoácido alifático) en el extremo C-terminal se clasifican como ROPs de tipo I, mientras que las proteínas que contienen una caja CAA se clasifican como ROPs de tipo II. Estos dominios determinan el tipo de modificación post-traducciona por prenilación: las ROP de tipo I incorporan un grupo geranil-geranilo y las ROP de tipo II sufren S-acilación (Liu et al. 2010).

La asociación de ROP con la membrana depende de las modificaciones lipídicas post-traduccionales que tienen lugar en la región hipervariable (HVR)

del extremo C-terminal. Varias líneas de investigación sugirieron que las proteínas ROP de tipo I y tipo II se localizan diferencialmente en las células bajo condiciones experimentales específicas. La identificación de la localización diferencial de las ROP de tipo I y tipo II puede no ser sencilla, ya que podría ser específica de tejido/célula, dependiente del estado de activación e interacción con factores adicionales (Yalovsky 2015).

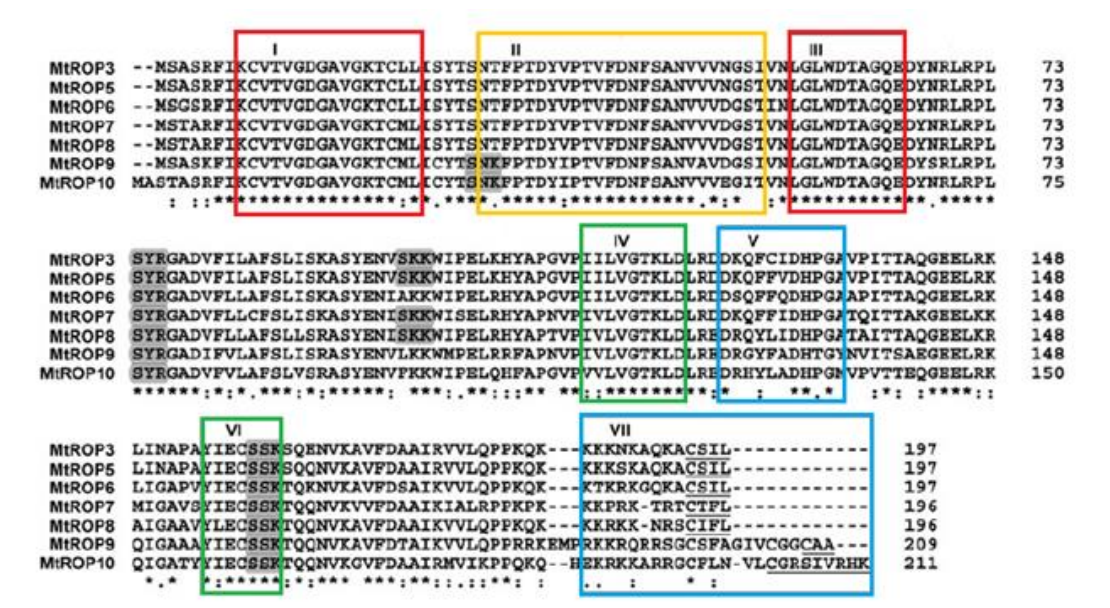


Figura 7. Dominios funcionales de las proteínas ROP. Dominios GTPasa (I y III), dominios de unión a GDP/GTP (IV y VI), dominio efector (II), región de inserción (V) y región hipervariable (HVR o VII). Los motivos mostrados en gris son sitios de fosforilación. Ilustración adaptada de Liu et al. 2010.

Por otra parte, la interacción simbiótica con rizobios involucra una reprogramación de la expresión génica de las células de la raíz vegetal, que va acompañada de importantes cambios en los perfiles de expresión. Esta reprogramación ocurre a diferentes niveles, desde el transcripcional al post-traducciona. En este contexto, se destaca la proteína ROP2, la cual cumple un rol en la regulación traduccional durante la respuesta a auxina (Schepetilnikov and Ryabova 2017).

Las auxinas son hormonas que controlan y regulan procesos claves de crecimiento y desarrollo en las plantas, así como respuestas a diversos estímulos ambientales. Estudios previos han demostrado la participación central de las

auxinas en ambos programas genéticos asociados a la nodulación, la infección y la formación del nódulo durante la simbiosis. Estas hormonas generan la activación de diferentes vías de señalización que pueden terminar en la activación de genes en el núcleo mediante la degradación de los represores transcripcionales Aux/IAA y la activación mediada por los factores de transcripción ARFs (Breakspear et al. 2014; Hobecker et al. 2017). Otras vías alternativas no incluyen la activación transcripcional y ocurren en el citoplasma, entre las que se encuentran las mediadas por proteínas ROP. La subfamilia ROP de GTPasas monoméricas pertenece al grupo de moléculas que actúan en respuesta a auxinas, promoviendo cambios en el citoesqueleto y en la endocitosis de transportadores de auxina (Tao, Cheung, and Wu 2002). Recientemente, un trabajo en *A. thaliana* ha relacionado la acción de la proteína ROP2 con la vía de reiniciación de la traducción de mRNAs que poseen *upstream* ORFs (uORFs) en respuesta a auxina. Esta activación involucra al complejo TOR, una proteína quinasa que actúa como regulador maestro de los programas de crecimiento y la respuesta al estrés (Schepetilnikov and Ryabova 2017).

Un análisis filogenético realizado sobre la superfamilia de GTPasas monoméricas en plantas leguminosas y no leguminosas (Flores et al. 2018) permitió identificar los genes con mayor similitud de secuencia a ROP2 de *Arabidopsis* en *M. truncatula* (Figura 8). El gen *Medtr4g073250* (MtROP2) se encuentra en el clado de las ROPs inducibles por auxina (Schepetilnikov et al. 2017).

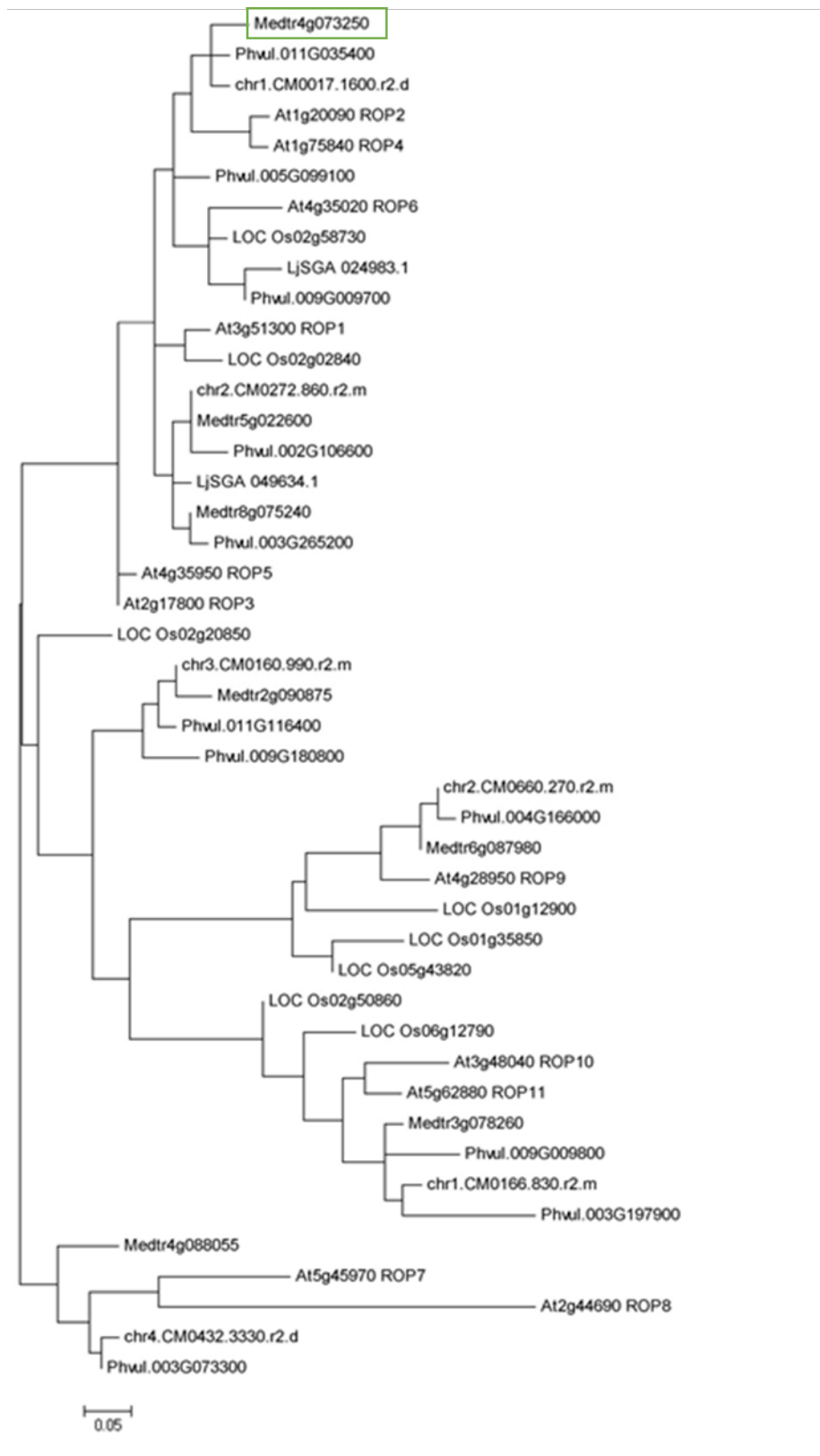


Figura 8. Árbol filogenético de la familia ROP. Se indica con un rectángulo verde el gen Medtr4g073250, que codifica para la proteína ROP con mayor homología a ROP2 de *A. thaliana*. Se incluyen secuencias de *Phaseolus vulgaris* (*Phvul*), arroz (*Oryza sativa*, *LOC Os*), *Arabidopsis*

thaliana (At) y *L. japonicus* (Lj) o cromosomas de *L. japonicus* (chr). Imagen tomada de Flores et al, 2018.

Debido a la importancia de esta GTPasa monomérica en la respuesta a auxina y la regulación traduccional, nuestro laboratorio inició el estudio de la función de ROP2 en el contexto de la nodulación. Dentro de este proyecto, uno de los objetivos fue estudiar y caracterizar el rol de ROP2 de *M. truncatula* durante la infección y el desarrollo del nódulo, estudiando su patrón de expresión y su función biológica a través de ensayos de genética reversa.

Estos resultados abren nuevos caminos para explorar la relación entre las GTPasas monoméricas de la familia ROP y los eventos tempranos de la infección bacteriana, logrando una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que contribuyen a la reprogramación génica de las células que participan en la simbiosis fijadora de nitrógeno en plantas leguminosas. Además, permitirán entender mejor el fenómeno biológico que conduce a la fijación biológica de nitrógeno, información que podrá ser utilizada en programas de mejoramiento de caracteres de gran importancia para la agricultura.

Objetivos

Objetivo general

El trabajo final denominado Laboratorio de Procesos Biotecnológicos tiene como finalidad que el estudiante obtenga una base firme de conocimientos que le permita adquirir experiencia en cuanto a la planificación, desarrollo y análisis de experimentos que requieren del uso de técnicas básicas de Biología Molecular.

El objetivo general del presente trabajo es analizar la función que cumple la GTPasa monomérica ROP2 en el contexto de la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti*.

Objetivos específicos

- 1- Generar plantas compuestas de *Medicago truncatula* con raíces transgénicas que presentan niveles reducidos de *Rop2* utilizando la estrategia de expresión de ARN de interferencia (RNAi-ROP2).
- 2- Caracterizar el fenotipo asociado a la nodulación de las plantas silenciadas RNAi-ROP2.
- 3- Analizar el patrón de expresión de *Rop2* en diferentes órganos de la planta y diferentes condiciones, mediante ensayos de transcripción reversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Materiales y métodos

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *M. truncatula* variedad Jemalong A17 fueron provistas por el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Montpellier, Francia. Las plantas fueron crecidas en cámaras de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80 % de humedad.

1.1 Medio de crecimiento

Para el crecimiento *in vitro* de plantas de *M. truncatula* se utilizó el medio Fahraeus:

Tabla 1. Composición del medio Fahraeus.

Componente	Concentración
CaCl ₂ .2H ₂ O	114 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	120 mg/l
Citrato Férrico	5 mg/l
KH ₂ PO ₄	100 mg/l
Na ₂ HPO ₄	150 mg/l
KCl	3,73 mg/l
H ₃ BO ₃	1,55 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0,85 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,58 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,018 mg/l

En los casos en que se utilizó medio Fahraeus suplementado con nitrógeno se agregó KNO₃ 808 mg/l concentración final. Cuando fue necesario utilizar medios sólidos se agregaron 10 g/l de agar.

1.2 Esterilización superficial y germinación de semillas

Para la esterilización superficial, las semillas de *M. truncatula* fueron escarificadas químicamente por tratamiento con H₂SO₄ 98% (v/v). Se realizaron ciclos de agitación de 30 segundos seguidos de 30 segundos en reposo hasta observar la aparición de puntos negros en las semillas. El H₂SO₄ fue removido y se realizaron tres lavados con agua destilada a 4 °C. Luego, las semillas fueron tratadas con 5 ml de hipoclorito de sodio 12 g/l durante 2 minutos, seguido de seis lavados con agua destilada estéril. Para la germinación *in vitro*, las semillas fueron transferidas con una pinza estéril a placas de Petri conteniendo agar-H₂O 8 % (p/v) (Figura 9). Para sincronizar la germinación y lograr el desarrollo de radículas rectas, las semillas se incubaron en posición invertida a 4 °C en oscuridad durante dos días. Posteriormente, las placas de Petri fueron transferidas a 20 °C. Al cabo de aproximadamente 30 horas se obtuvieron radículas de 10 mm de longitud, que se utilizaron para la transformación con *A. rhizogenes*.

Para el análisis del patrón de expresión de *Rop2* en distintos órganos de *M. truncatula*, las semillas germinadas fueron transferidas a cajas cuadradas de acrílico estériles conteniendo agar-Fahraeus y papel húmedo. Las plantas *wild-type* fueron incubadas durante dos semanas en una cámara de cultivo Sanyo a 20 °C, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80% de humedad.

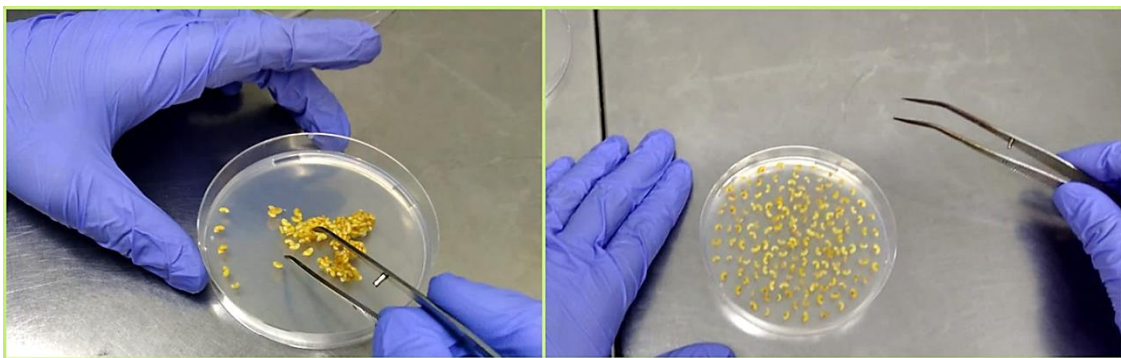


Figura 9. Semillas de *M. truncatula* transferidas a placas de Petri estériles conteniendo agar-H₂O.

1.3 Transformación de raíces de *M. truncatula* mediante *A. rhizogenes*

La transformación de las semillas germinadas se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la literatura (Boisson-Dernier et al. 2001). Las cepas de *A. rhizogenes* Arqua-1 transformadas con la construcción para silenciamiento y el plásmido control fueron crecidas y seleccionadas en placas de Petri conteniendo medio LB-agar y espectinomicina 200 µg/ml, a 28 °C durante dos días.

Trabajando en condiciones de esterilidad, se colocaron las semillas germinadas sobre una placa de Petri conteniendo agua para evitar la desecación de las mismas (Figura 10A), y se realizó un corte en la radícula a una distancia de 3 mm del extremo con un bisturí estéril (Figura 10B). Posteriormente, se puso en contacto la región seccionada con el cultivo en placa de *A. rhizogenes* (Figura 10C) La selección de las plántulas transgénicas se realizó en placas de Petri conteniendo medio agar-Fahraeus inclinado suplementado con KNO₃ 808 mg/l y kanamicina 12,5 mg/l (Figura 10D). Luego, las plántulas fueron incubadas en posición vertical en una cámara Sanyo con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y 80% de humedad, durante dos semanas a 20 °C (Figura 10E). Las plántulas que desarrollaron raíces transgénicas fueron transferidas en condiciones de esterilidad a cajas cuadradas de acrílico (12cm x 12cm x 1cm) conteniendo medio agar-Fahraeus sin KNO₃, para su crecimiento y posterior inoculación con rizobio (Figura 10F). Las plantas transformadas se incubaron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-351HT a 20 °C, en las condiciones de crecimiento previamente descritas. Después de siete días de crecimiento, se procedió a realizar la inoculación de las plantas con la cepa 1021 de *S. meliloti*.

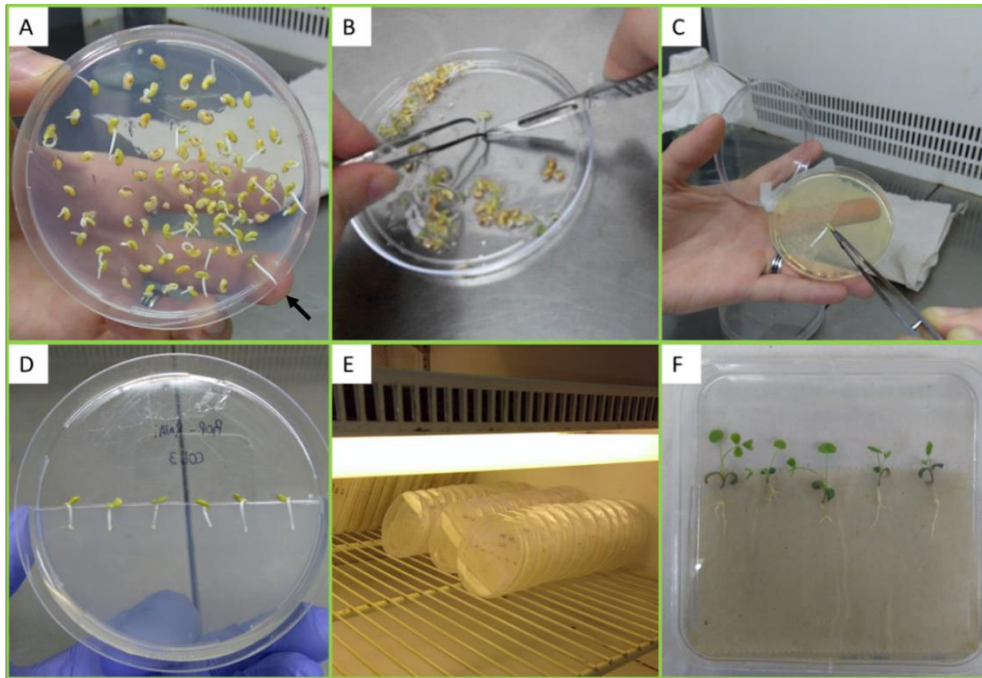


Figura 10. Método de transformación de raíces de *M. truncatula*. A) Semillas de *M. truncatula* germinadas en placas de Petri. La flecha señala una semilla con su radícula crecida. B) Corte de la radícula de la semilla con bisturí en condiciones de esterilidad. C) Raspado de un cultivo de *A. rhizogenes* para formar un botón de bacterias en la incisión que se realizó con el bisturí. D) Las radículas cortadas con el botón de bacterias se colocaron en placas de Petri con el antibiótico de selección para las raíces transgénicas. E) Las placas de Petri se incubaron en cámaras de cultivo. F) Plantas crecidas de 14 días ya transferidas a cajas de acrílico.

1.4 Inoculación de raíces con *S. meliloti*

Para la inoculación de *M. truncatula* con su par simbiote *S. meliloti*, se utilizó el protocolo reportado por (Journet et al. 2006). A partir de una estría de un cultivo de *S. meliloti* 1021 crecido en placa de Petri conteniendo medio agar-TY con estreptomycin 200 $\mu\text{g/ml}$, se inoculó un cultivo líquido de medio TY con la misma concentración de antibiótico y se incubó a 28 °C y 200 rpm de agitación por 24 horas. A partir de este pre-cultivo saturado, se inoculó un nuevo cultivo líquido de medio TY con la misma concentración de antibiótico, y se dejó crecer hasta obtener una DO_{600} igual a 0,8. Posteriormente, se realizó una dilución del cultivo en agua destilada estéril, de forma tal de obtener una solución bacteriana con una concentración de 5×10^5 bacterias/ml. Luego, se utilizaron 10 ml por caja de esta solución de *S. meliloti* 1021 para la inoculación de las plantas transgénicas, a los siete días de haber sido transferidas a las cajas cuadradas.

Las cajas se mantuvieron durante una hora en posición horizontal, luego se descartó el exceso de solución bacteriana y se transfirieron nuevamente a la cámara de cultivo, donde se incubaron en posición vertical en las mismas condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente.

1.5 Tratamiento de raíces con auxina exógena

Se utilizaron 10 ml por caja de una solución de auxina 10 μ M (ácido indol acético, IAA) para el tratamiento de raíces de *M. truncatula* a los siete días de haber sido transferidas a cajas cuadradas conteniendo medio agar-Fahraeus sin KNO_3 . Las cajas se mantuvieron durante una hora en posición horizontal, luego se descartó el exceso de solución de auxina y se transfirieron nuevamente a la cámara de cultivo, donde se incubaron en posición vertical en las mismas condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente.

1.6 Recolección de tejido

La recolección del tejido de raíces, tallo y hojas se realizó a partir de plantas *wild type* crecidas en cajas cuadradas durante dos semanas. Por otro lado, también se recolectó tejido de raíces a partir de plantas *wild type* 24 y 48 horas post-inoculación (hpi) con *S. meliloti* (Sm), con agua destilada estéril como control (mock), o tratadas con auxinas (IAA). El tejido se colectó en N_2 líquido y se pulverizó en mortero, previniendo en todo momento que el tejido se descongelara para evitar la acción de RNAsas. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80 °C.

1.7 Cinética de nodulación

La cuantificación del número de nódulos se realizó al cabo de 7, 10, 14 y 21 días post-inoculación (dpi), visualizando los nódulos en un transiluminador de luz blanca. Se contaron los nódulos formados por raíz, dado que en el método de transformación utilizado cada raíz transgénica representa un evento de transformación independiente. Además, a los 21 dpi se realizó, por un lado, una distinción entre nódulos blancos y nódulos rosas, y por el otro, se midió el tamaño de los nódulos formados. El tamaño de los nódulos se determinó a partir de fotos tomadas a las plantas transformadas, se seleccionaron al azar tres nódulos de

cada planta, en los casos en que fuera posible, y se determinó el tamaño de los mismos utilizando las herramientas gráficas del programa Adobe Photoshop CS3. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente y graficados usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

2. Cepas bacterianas utilizadas

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas y sus aplicaciones.

Cepa	Aplicación
<i>E. coli</i> TOP10	Utilizada para la propagación y el mantenimiento de plásmidos.
<i>E. coli</i> ccdB survival	Utilizada para la propagación y el mantenimiento de plásmidos que contienen el gen <i>ccdB</i> .
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> Arqua-1	Utilizada para la transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> .
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Cepa de rizobio capaz de formar nódulos fijadores de N ₂ , utilizada para la inoculación de raíces de <i>M. truncatula</i> .

2.1 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB (Luria-Bertani) líquido a 37 °C y 250 rpm de agitación, o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB-agar. El medio LB fue suplementado con los antibióticos correspondientes.

La cepa de *A. rhizogenes* fue crecida en medio LB líquido a 28 °C y 250 rpm de agitación o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB-agar. El medio LB fue suplementado con los antibióticos correspondientes.

La cepa de *S. meliloti* fue crecida en placas de Petri con medio TY sólido o líquido a 28 °C y a 250 rpm, suplementado con los antibióticos correspondientes.

2.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento de *A. rhizogenes* y *E. coli* se utilizó medio LB:

Tabla 3. Composición del medio LB.

Componente	Concentración
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH final	7,2

En los casos en que se utilizó medio sólido se agregaron 15 g/l de agar.

Para el crecimiento de *S. meliloti* se utilizó medio TY:

Tabla 4. Composición del medio TY.

Componente	Concentración
Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,6 g/l

En los casos en que se utilizó medio sólido se agregaron 15 g/l de agar.

2.3 Antibióticos

Se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos en medios de cultivo sólidos o líquidos, para la selección de cada cepa bacteriana:

Tabla 5. Antibióticos utilizados durante el presente trabajo.

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>S. meliloti</i>
Kanamicina	50 µg/ml	-	-

Espectinomicina	50 µg/ml	200 µg/ml	-
Estreptomomicina	-	-	200/ml

2.4 Transformación de células de *E. coli* y *A. rhizogenes* electrocompetentes

Las células electrocompetentes fueron transformadas mediante un pulso eléctrico de 2,2 KV o 2,5 KV para *E. coli* y *A. rhizogenes* respectivamente, durante 5 milisegundos, con una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200 Ω para *E. coli* y 400 Ω para *A. rhizogenes*, utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser (BioRad) y cubetas de electroporación estériles de 2 mm de espesor. En las cubetas se colocaron 50 µl de bacterias electrocompetentes previamente mezcladas con 150 ng del plásmido de interés, e inmediatamente se procedió a la electroporación. Luego del pulso se agregó 1 ml de medio LB fresco, la suspensión bacteriana se trasvasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y se incubó durante 1 hora con agitación a la temperatura de crecimiento óptima para su recuperación, 37 °C para *E. coli* y 28 °C para *A. rhizogenes*. Finalmente, la suspensión de células se centrifugó a 8.000 g durante 1 minuto, se resuspendió en 100 µl de medio residual y luego fue sembrada en una placa de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección positiva de las bacterias transformadas. Las placas se incubaron a la temperatura de crecimiento adecuada durante toda la noche.

2.5 Glicerol stocks

A partir de cultivos bacterianos en fase exponencial se realizaron stocks de glicerol 15 % v/v. Se tomaron 975 µl del cultivo bacteriano y se les agregó 225 µl de glicerol 80% estéril. Se almacenaron en freezer a -80 °C hasta su utilización. Este método permite la conservación a largo plazo de las cepas bacterianas.

3. Técnicas de biología molecular

3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de fragmentos de ADN por PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Mastercycler gradient (Eppendorf). El volumen final de la reacción fue de 10 μ l. La composición de la mezcla de reacción cuando se utilizó la enzima *Taq* polimerasa fue:

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción de PCR, utilizando la enzima *Taq* polimerasa.

Reactivo	Volumen
ADN molde	0,5 μ l
<i>Buffer</i> de reacción 10X	1 μ l
MgCl ₂ 50 mM	0,3 μ l
dNTPs 10 mM	0,2 μ l
<i>Primer</i> directo 10 μ M	0,25 μ l
<i>Primer</i> reverso 10 μ M	0,25 μ l
Enzima <i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μ l	0,075 μ l
Agua destilada estéril	7,425 μ l

La composición de la mezcla de reacción cuando se utilizó la enzima *Pfu* polimerasa fue:

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción de PCR, utilizando la enzima *Pfu* polimerasa.

Reactivo	Volumen
ADN molde	2,5 μ l
<i>Buffer</i> de reacción 10X	1,25 μ l
dNTPs 10 mM	0,25 μ l

<i>Primer</i> directo 10 μ M	0,35 μ l
<i>Primer</i> reverso 10 μ M	0,35 μ l
Enzima <i>Pfu</i> 5 U/ μ l	0,15 μ l
Agua destilada estéril	5,15 μ l

Como molde se utilizaron células, plásmidos, ADN genómico, cDNA o ARN dependiendo del caso. El número de ciclos y el tiempo de elongación fueron diferentes en función del tamaño del fragmento a amplificar, tomando como referencia 1 minuto por cada mil pares de bases. La temperatura de elongación se ajusta en base a la enzima que se utilizó para la amplificación, siendo 72 °C para la enzima *Taq* y 68 °C para la enzima *Pfu*. La temperatura de hibridación fue ajustada en cada caso utilizando en general 5 °C por debajo de la temperatura de *melting* de los *primers*. El programa estándar consistió en una primera etapa de 5 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C para la enzima *Taq*, y finalmente una etapa de 5 minutos a 72 °C.

Las secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 8. Los *primers* se diseñaron con el programa SerialCloner y fueron analizados en detalle con la herramienta OligoAnalyzer de IDT, para calcular la posible formación de dímeros de *primers* y estructuras secundarias.

Tabla 8. Lista de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR.

<i>Primer</i>	Secuencia (5'-3')
M13 directo	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 reverso	CAG GAA ACA GCT ATG AC
p35S	GAT GAC GCA CAA TCC CAC TAT CC
KAN	CGT AAA ACG GCT TGT CCC G
RNAi Rop2 directo	CACC ^a TGG TAG TCT TTG CCA TTC

RNAi Rop2 reverso CCA ATG AAC AAA CCG AGC TA

HIS 3L directo ATT CCA AAG GCG GCT GCA TA

HIS 3L reverso CTT TGC TTG GTG CTG TTT AGA TGG

^a En rojo se marca la secuencia requerida para el clonado direccional de la construcción RNAi-ROP2 en el vector pENTR/D-TOPO.

En la variante de PCR llamada *colony* PCR, se tomó al azar una muestra de una colonia de bacterias con un palillo de madera estéril bajo flujo laminar y se lo sumergió en la mezcla de reacción, de manera tal de transferir una pequeña cantidad de bacterias. Luego, el palillo se colocó en un tubo conteniendo medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente para obtener un cultivo de cada colonia analizada.

Para evaluar la concentración de los cDNAs sintetizados, se realizó una PCR semi-cuantitativa. En este caso, se utilizó el programa estándar de la reacción de PCR, pero se efectuó una modificación del mismo utilizando 25 ciclos en lugar de 35. De esta forma, se evita la saturación de la reacción, haciendo posible estimar la concentración de las muestras de cDNA.

3.2 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN, ARN y los productos de las reacciones de PCR fueron analizados en geles de agarosa en un rango de concentración entre 0,8 % a 1 % (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver. Para separar y visualizar los fragmentos, el gel se preparó disolviendo la agarosa en *buffer* TBE 0,5X (Tris base 0,045 M, H₃BO₃ 0,045 M, EDTA 0,5 mM, pH 7,2) y se añadió bromuro de etidio (BrEt) 0,5 µg/ml para visualizar las bandas. Las muestras de ARN o ADN se mezclaron en una relación 1:6 con *buffer* de siembra 6X (*buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromo fenol 1 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0) y se sembraron en el gel junto a un patrón de peso molecular. Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5 X a un voltaje constante de 90 V. Finalmente, las bandas obtenidas correspondientes a ARN o

ADN se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV y se capturaron imágenes con un sistema de documentación de geles UVIdoc HD5 (Uvitec Cambrigde).

3.3 Minipreparación de ADN plasmídico

A partir de una colonia bacteriana (crecida previamente en placa de Petri) transformada con el plásmido correspondiente, se inoculó un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Luego, el cultivo fue incubado a 37 °C con agitación durante 24 horas, obteniéndose un cultivo saturado con una turbidez característica del crecimiento microbiano. A partir de este cultivo líquido se realizó el aislamiento de ADN plasmídico, utilizando el kit Puro plásmido minipreps de PB-L, siguiendo las instrucciones detalladas por el proveedor. Por último, se verificó la minipreparación por electroforesis en gel de agarosa.

3.4 Digestión enzimática del ADN

Las reacciones de digestión del ADN con enzimas de restricción se realizaron en una mezcla de reacción que contenía agua libre de nucleasas, el *buffer* de reacción recomendado por el proveedor, 0,5-1 µg de ADN plasmídico y 2-5 U de la enzima de restricción. La reacción se incubó durante 2-3 horas a la temperatura óptima de la enzima de restricción utilizada en cada caso. Finalizada la incubación, se verificó la digestión por electroforesis en gel de agarosa.

3.5 Construcción de vectores mediante el sistema de clonado GATEWAY

Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados en el vector de entrada pENTR/D-TOPO, siguiendo el protocolo detallado por el fabricante (Invitrogen). Brevemente, se incubaron 1-5 ng del fragmento amplificado con 0,5 µl del vector pENTR/D-TOPO y 0,5 µl de solución salina a 22°C durante toda la noche, y el producto de la reacción se utilizó para transformar células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes.

Posteriormente, el vector de entrada pENTR/D-TOPO conteniendo el fragmento clonado fue recombinado con el vector de destino pK7GWIWG2D (II), el cual permite la doble inserción del fragmento en forma directa y en forma invertida, produciendo repeticiones invertidas que formarán una horquilla en el

RNA. La reacción de recombinación sitio-específica se llevó a cabo utilizando la enzima LR clonasa, siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Se mezclaron 2 µl del vector pENTR/D-TOPO con el inserto clonado, 2 µl del vector pK7GWIWG2D (II) y 1 µl de la enzima LR clonasa (Invitrogen). La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante toda la noche. Luego de este paso se adicionaron 0,5 µl de proteinasa K para inactivar la enzima y se incubó 10 minutos a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes.

3.6 Extracción de ARN

A partir de las muestras de tejido colectadas y almacenadas a -80 °C, se realizaron las extracciones de ARN total. Se llevó a cabo una extracción con Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo provisto por el proveedor, el cual consiste en los cinco pasos siguientes:

1. Homogeneización: se agregaron 800 µl de reactivo Trizol por cada 50-100 mg de tejido pulverizado (aproximadamente 3 puntas de espátula). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos en vórtex y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos.
2. Separación de fases: para la separación de fases se agregaron 200 µl de cloroformo bajo campana, se agitó vigorosamente durante 15 segundos en vórtex y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 *g* durante 15 minutos a 4 °C. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una fase acuosa, que contiene el ARN, y una fase orgánica, donde se encuentran las proteínas. En la interfase se localiza el ADN. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf, evitando tomar la interfase.
3. Precipitación de ARN: se agregó un volumen de isopropanol igual al volumen de la fase acuosa obtenida, aproximadamente 500 µl. Se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 20 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 12.000 *g* durante 20 minutos a 4 °C, obteniéndose un precipitado de color blanco.

4. Lavado de ARN: se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 800 μ l de etanol 75 % frío para eliminar las sales. Luego se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante de etanol 70 % y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Solubilización de ARN: una vez seco, el precipitado de ARN se resuspendió en 50 μ l de agua miliQ estéril. La solución se incubó durante 15 minutos a 55 °C en un baño seco para solubilizar el ARN y finalmente se almacenó a -80 °C.

3.7 Cuantificación del ARN

La concentración de ARN de las muestras se estimó a partir de la cuantificación de la absorbancia medida en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

3.8 Tratamiento de las muestras de ARN con DNAsa

Para eliminar el posible ADN genómico contaminante en las muestras de ARN, se realizó una digestión con DNAsa libre de RNAsa. Se digirió 1 μ g de ARN con una unidad de la enzima RQ1 DNAsa libre de RNAsa (Promega), *buffer* 1X y agua miliQ estéril en un volumen final de 10 μ l. Se incubó durante 1 hora a 37 °C, luego se agregó 1,5 μ l de la solución Stop (EGTA 20 mM, Promega) y se incubó durante 15 minutos a 65 °C para inactivar la enzima.

3.9 Síntesis de cDNA

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó a partir de 1 μ g de RNA tratado con DNAsa libre de RNAsa. A cada muestra de ARN se le adicionó 1 μ l de oligodT, se incubó a 70 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y se enfrió rápidamente en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 5 μ l de *buffer* de reacción 5X M-MVL RT (Promega), 1,25 μ l de dNTPs 10 mM y 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Promega), llevando a un volumen final de 25 μ l con agua miliQ estéril. La síntesis de cDNA se realizó incubando la muestra durante 90 minutos

a 42 °C. Finalmente se realizó una dilución 1/100 de las muestras de cDNA con agua estéril y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.10 Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Las reacciones para medir los niveles de expresión de los transcritos de *Rop2* se llevaron a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real (CFX96 Real Time System C1000 Thermal Cyclers, Bio-Rad), utilizando como molde cDNAs sintetizados previamente y *primers* específicos de la secuencia de *MtRop2* (Tabla 9). La normalización de los datos fue realizada mediante la amplificación del transcripto *HISTONE 3 LIKE (HIS3L)* de *M. truncatula*, utilizando *primers* específicos para la secuencia de este gen (Tabla 9). Además, se realizaron controles negativos usando agua miliQ estéril en reemplazo del cDNA.

Para la cuantificación de los transcritos se utilizó una mezcla de reacción que consistió en 2,5 µl de cDNA, 0,5 µl de cada *primer* (directo y reverso), 5 µl de SYBER Green master mix 2X (Bio-Rad) y 1,5 µl de agua estéril, en un volumen final de 10 µl. Cada reacción incluyó una primera etapa de 5 minutos a 95 °C, seguida de 45 ciclos de 23 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 20 segundos a 72 °C, y un único ciclo final de 5 minutos a 65 °C. Se verificó la amplificación de un solo fragmento mediante la inclusión de una curva de melting utilizando el programa incluido en el software del instrumento. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente y graficados usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Tabla 9. Lista de los *primers* utilizados para el análisis por RT-qPCR.

Primer	Secuencia (5'-3')
HIS 3L directo	ATT CCA AAG GCG GCT GCA TA
HIS 3L reverso	CTT TGC TTG GTG CTG TTT AGA TGG
qPCR Rop2 directo	CAC CCC CCT ATT TCA TCT TC
qPCR Rop2 reverso	GGA ACC ACT CAT TTC AGA ACC

Resultados y discusión

Sección 1

1. Generación de la construcción para el silenciamiento del transcripto *ROP2* por RNA de interferencia

Con el fin de dilucidar la función de ROP2 durante la simbiosis, se generó una construcción que permite reducir los niveles de expresión de *Rop2* en raíces de plantas de *M. truncatula*, utilizando una estrategia de silenciamiento post-transcripcional basada en la expresión de un RNA de interferencia (RNAi). La expresión del RNAi, el cual consiste en una horquilla de RNA doble hebra conteniendo una secuencia de 300-400 nucleótidos idéntica a la del transcripto de *ROP2*, dará lugar a la producción de pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) que van a producir el clivaje endonucleolítico mediado por el complejo RISC (RNA induced silencing complex).

Para generar la construcción de silenciamiento, en primer lugar, se amplificó por PCR un fragmento de 375 pb del gen *Rop2* (Medtr4g073250), seleccionado a partir de la secuencia genómica (Figura 11). Esta reacción se llevó a cabo utilizando como molde cDNA de raíz de *M. truncatula* (cedido gentilmente por la Lic. Cristina Kirolinko), los *primers* RNAi Rop2 directo y RNAi Rop2 reverso específicos de la secuencia de *Rop2* (Tabla 8 de Materiales y métodos) y la enzima *Pfu*, que además de actividad polimerasa posee actividad de *proofreading*. Cabe destacar que el *primer* directo posee la secuencia CACC en el extremo 5', la cual permite el posterior clonado del fragmento en el vector pENTR/D-TOPO.

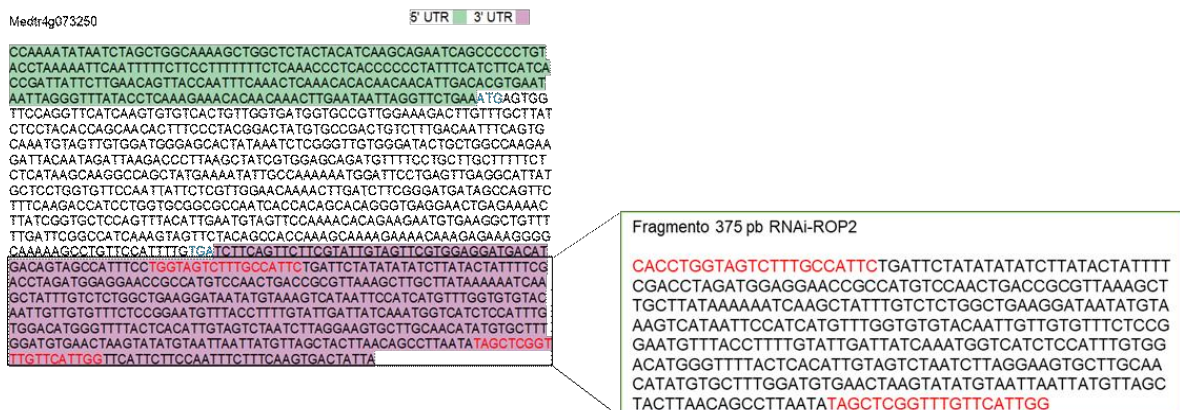


Figura 11. Secuencia del cDNA de *Rop2*. Las regiones no traducidas 5' y 3' están sombreadas en verde y violeta, respectivamente. En celeste se indican el codón de inicio de la traducción (ATG) y el de STOP (TGA). El *inset* contiene la región seleccionada para construir el RNAi, donde se muestran los *primers* utilizados en la reacción de PCR.

El producto de amplificación de la reacción de PCR fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v), obteniéndose la banda del tamaño esperado correspondiente al fragmento del gen *Rop2* (Figura 12A). Luego de la electroforesis, se escindió la banda del gel correspondiente al tamaño esperado de 375 pb y se realizó la extracción del ADN. La purificación fue analizada en un gel de agarosa (Figura 12B).

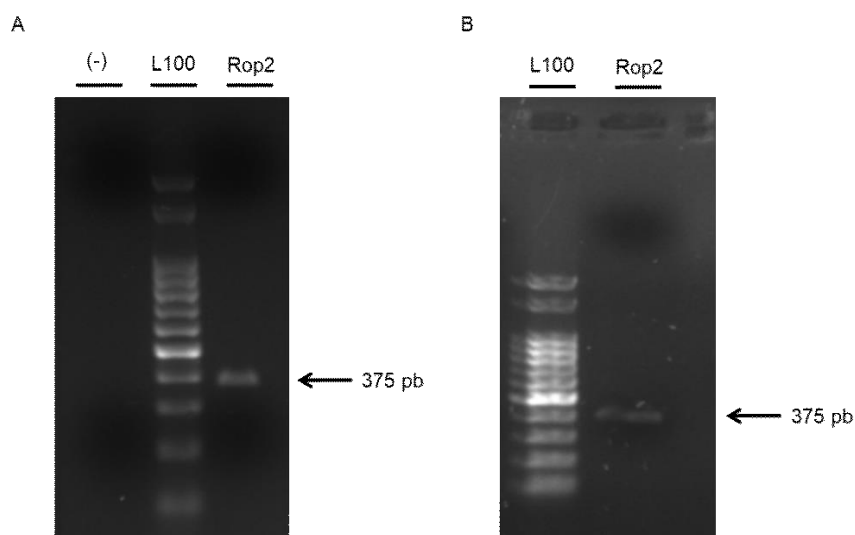
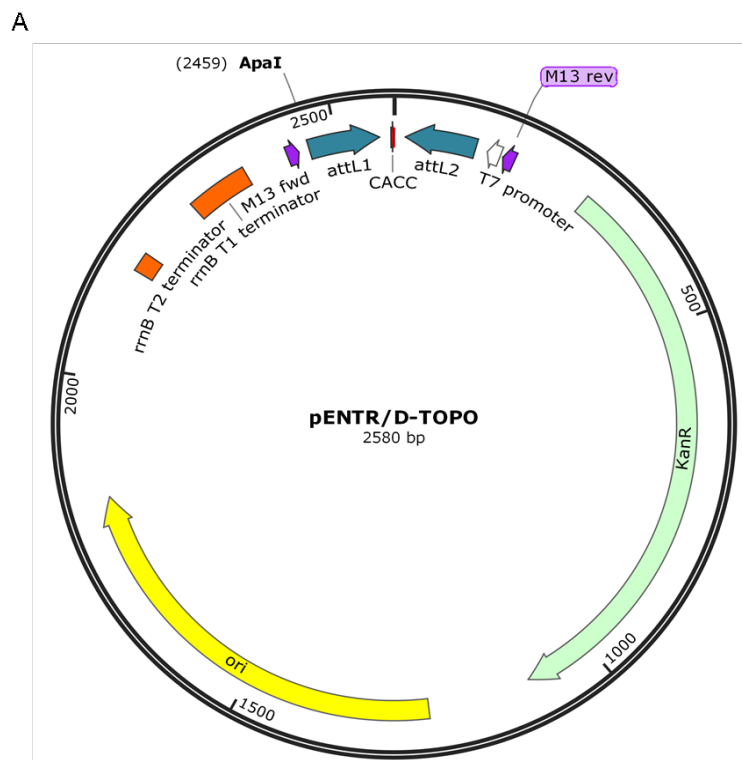


Figura 12. Amplificación por PCR de un fragmento de *Rop2*. A) Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) del producto de amplificación por PCR del fragmento *Rop2*. En el carril de la derecha (*Rop2*) se observa una banda de aproximadamente 375 pb. El control negativo (-) corresponde a una reacción de PCR en la cual no se adicionó cDNA. B) Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) donde se sembró el fragmento *Rop2* purificado a partir del gel anterior. Como marcador de peso molecular se utilizó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

Una vez obtenido el fragmento deseado, el mismo fue clonado en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR/D-TOPO (Figura 13A), para obtener la construcción pENTR-RNAi ROP2 (Figura 13B).

El sistema de clonado pENTR/D-TOPO permite incorporar de forma direccional un producto de PCR de extremos romos en el vector de entrada, utilizando una reacción de ligación. El vector pENTR-/D-TOPO contienen un

extremo cohesivo GTGG en el extremo 5' y un extremo romo en el extremo 3'. El extremo cohesivo de cuatro nucleótidos invade la doble hebra de ADN del producto de PCR y se une a la secuencia CACC, que se adiciona en el extremo 5' del *primer* directo. Luego, la topoisomerasa I, que se encuentra unida covalentemente a los extremos del vector, liga el producto de PCR y el vector en la orientación correcta. La topoisomerasa I del virus Vaccinia se une al ADN doble hebra en sitios específicos (CCCTT) y corta los enlaces fosfodiéster en una hebra (Shuman 1991). La energía liberada del enlace fosfodiéster permite la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la hebra clivada y un residuo tirosina (Tir-274) de la topoisomerasa I. El enlace fosfo-tirosina entre el ADN y la enzima puede ser atacado posteriormente por el 5' hidroxilo de la hebra escindida original, invirtiendo la reacción y liberando la topoisomerasa I (Shuman 1994) (Figura 14).



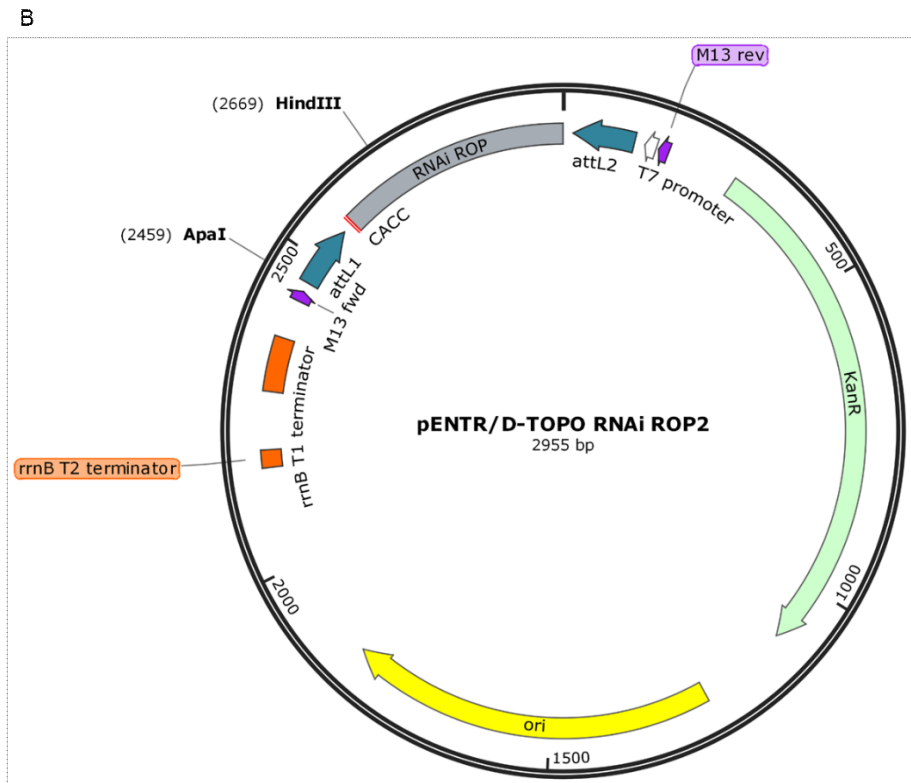


Figura 13. A) Esquema del vector pENTR/D-TOPO, utilizado para el clonado del fragmento del gen *Rop2*. B) Esquema del vector pENTR-RNAi ROP2. ori: origen de replicación del plásmido. KanR: gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias. *attL* 1/2: sitios de recombinación sitio-específica del fago lambda, los cuales flanquean el fragmento de interés. Se indican los sitios de corte de algunas enzimas de restricción (*ApaI* y *HindIII*) y *primers* universales (M13 directo y reverso).

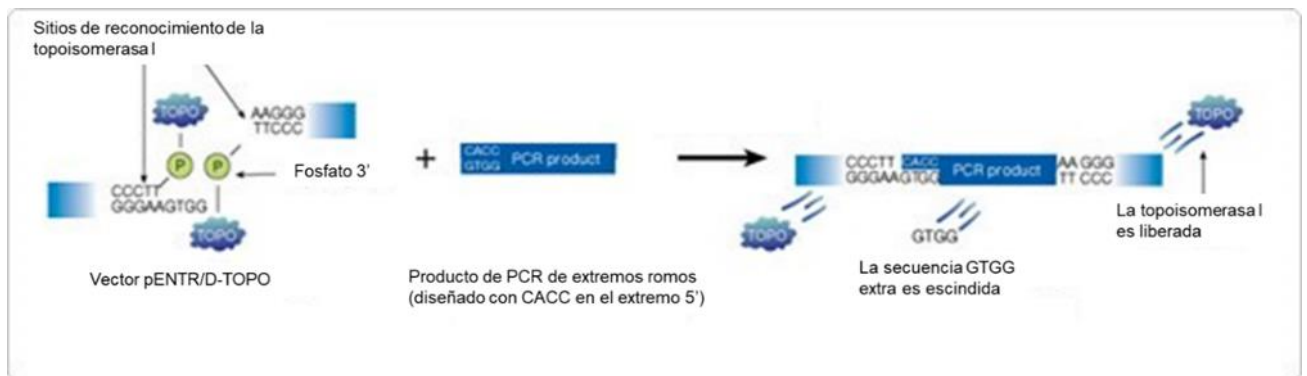


Figura 14. Clonado direccional de un fragmento amplificado por PCR de extremos romos en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Se muestra la acción de la topoisomerasa I en la reacción de ligación.

Con el producto de la reacción se transformaron células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Luego de la transformación, las células se plaquearon en

medio LB-agar conteniendo kanamicina 50 µg/ml como agente de selección. Se obtuvieron varias colonias, de las cuales se seleccionaron ocho para ser analizadas. Con el objetivo de verificar que dichas colonias efectivamente contuvieran la construcción de interés (pENTR-RNAi ROP2), se realizó una reacción de *colony* PCR utilizando los *primers* RNAi Rop2 directo y RNAi Rop2 reverso específicos del fragmento (Tabla 8 de Materiales y métodos). Los productos de la reacción de *colony* PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 15). Se obtuvo una banda del tamaño esperado de 375 pb en las ocho colonias analizadas.

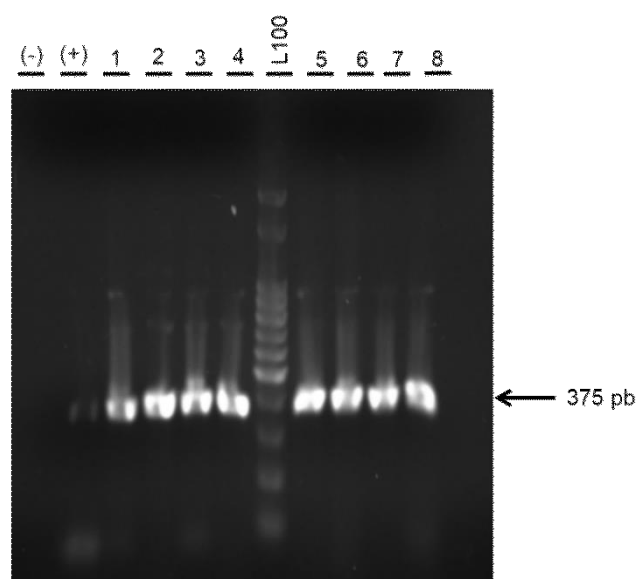


Figura 15. *Colony* PCR para verificar la presencia de la construcción pENTR-RNAi ROP2. Se realizó la reacción de PCR sobre las colonias transformadas con la construcción pENTR-RNAi ROP2. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) donde se sembraron los productos de las reacciones de PCR realizadas a partir de ocho colonias elegidas al azar (1 a 8). El amplicón presentó el tamaño esperado de 375 pb en las ocho colonias. El control negativo (-) corresponde a una reacción de PCR en la cual no se adicionó bacteria a la mezcla de reacción, mientras que para el control positivo (+) se utilizó un cDNA disponible en el laboratorio como molde. Como marcador de peso molecular se usó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

A partir de la colonia 2 se realizó un cultivo en medio LB líquido suplementado con kanamicina 50 µg/ml como antibiótico de selección. Luego, se procedió a la purificación del plásmido a partir de dicho cultivo líquido saturado. La electroforesis en gel de agarosa mostró que se obtuvo ADN plasmídico a partir de la minipreparación (Figura 16A, calle 3). Luego, para

comprobar que el fragmento se encontrara clonado correctamente en el vector, se realizó una digestión enzimática con las enzimas de restricción *Apal* y *HindIII*. La electroforesis en un gel de agarosa del producto de la digestión mostró que se obtuvieron los dos fragmentos de los tamaños esperados (214 pb y 2.741 pb) (Figura 16A, calle 2). Además, se realizó una amplificación por PCR sobre el vector pENTR-RNAi ROP2, utilizando los *primers* RNAi Rop2 directo y M13 reverso (Tabla 8 de Materiales y métodos). Los productos de la reacción de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa, obteniéndose un fragmento con el tamaño de banda esperado de 552 pb (Figura 16B). Este análisis permitió verificar la correcta inserción del fragmento y su adecuada orientación. Posteriormente, se secuenció dicha construcción y se confirmó la identidad y la correcta direccionalidad del fragmento del gen *Rop2* clonado (ver Anexo 1 en Material suplementario).

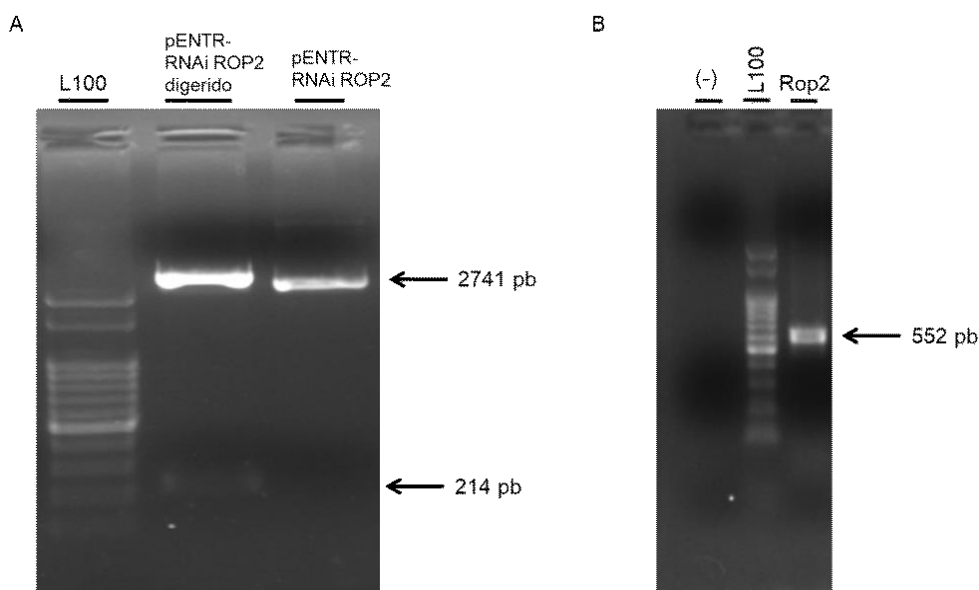


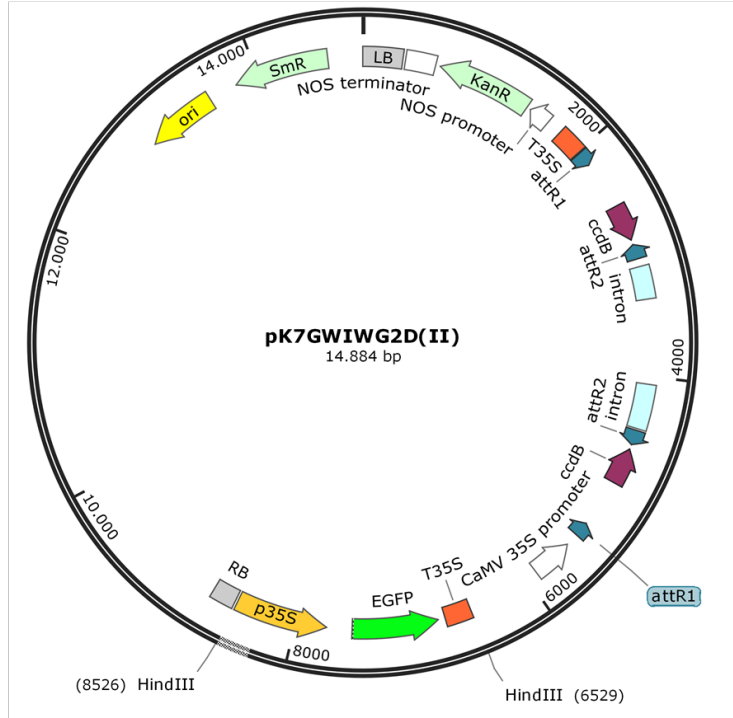
Figura 16. Purificación y análisis del vector pENTR-RNAi ROP2. A) Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) de una minipreparación de ADN plasmídico obtenido a partir de la colonia 2 (pENTR-RNAi ROP2), y de la digestión enzimática de dicho vector con las enzimas *Apal* y *HindIII* (pENTR-RNAi ROP2 digerido). B) Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) del producto de amplificación por PCR del fragmento del gen *Rop2* clonado en el vector pENTR/D-TOPO utilizando *primers* RNAi Rop2 directo y M13 reverso. El control negativo (-) corresponde a una reacción de PCR en la cual no se adicionó ADN. Como marcador de peso molecular se utilizó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

El siguiente paso fue transferir el fragmento RNAi-ROP2 desde el vector de entrada al vector de destino, utilizando la tecnología de clonado Gateway. La tecnología Gateway es un método de clonado universal que aprovecha las propiedades de recombinación sitio-específicas del fago lambda (Landy 1989) para proporcionar una forma rápida y altamente eficiente de mover un gen de interés a múltiples sistemas de vectores.

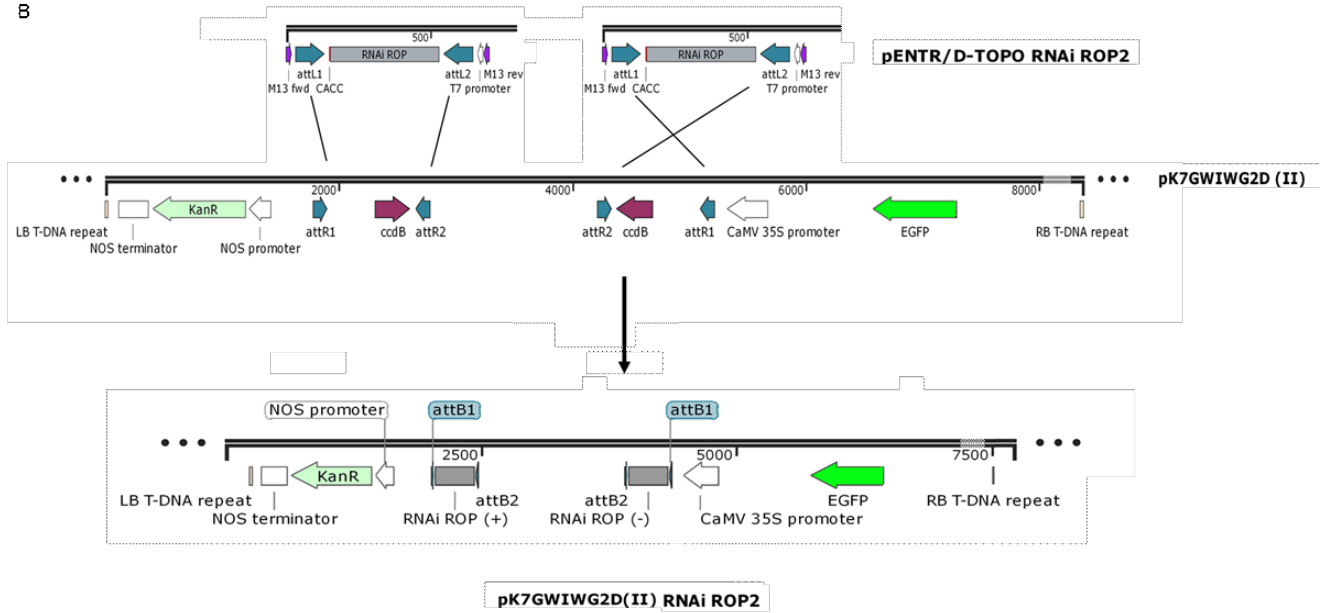
La transferencia del fragmento de un vector al otro se llevó a cabo mediante la recombinación sitio específica entre el vector de entrada pENTR-RNAi ROP2 y el vector de destino pK7GWIWG2D(II) (Figura 17A), utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen), la cual cataliza la reacción de recombinación entre los sitios *attL1* y *attL2* presentes en el pENTR/D-TOPO y los sitios *attR1* y *attR2* presente en el vector de destino (Figura 17B). Cabe mencionar que el vector de destino posee dos regiones *attR1* y *attR2* ubicados en diferente orden. De esta manera se obtiene la construcción deseada, denominada pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 (Figura 17C). La expresión de esta construcción da origen a un ARN con repeticiones invertidas que forma una estructura de horquilla (Figura 17D).

El vector de destino seleccionado, pK7GWIWG2D(II) (Figura 17A), es un vector binario que contiene los bordes derechos (RB) e izquierdos (LB) del T-DNA de *A. rhizogenes*, requeridos para la transferencia e inserción del ADN que dirige la expresión del gen de interés bajo el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S en las raíces de *M. truncatula*. A su vez, este vector posee el gen de resistencia a kanamicina para la selección de las plantas transformadas, y el gen de resistencia a espectinomicina para la selección en bacterias. El gen *ccdB* codifica para una bacteriotoxina que inhibe la replicación del ADN por interferencia con la ADN girasa en varias cepas de *E. coli*. Es por esto que solamente aquellas bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido recombinado, donde el cassette *ccdB* fue reemplazado por la secuencia de interés, podrán sobrevivir debido a la ausencia de la bacteriotoxina. De esta forma, luego de la recombinación, será posible seleccionar positivamente las bacterias transformadas con el plásmido recombinado.

A



B



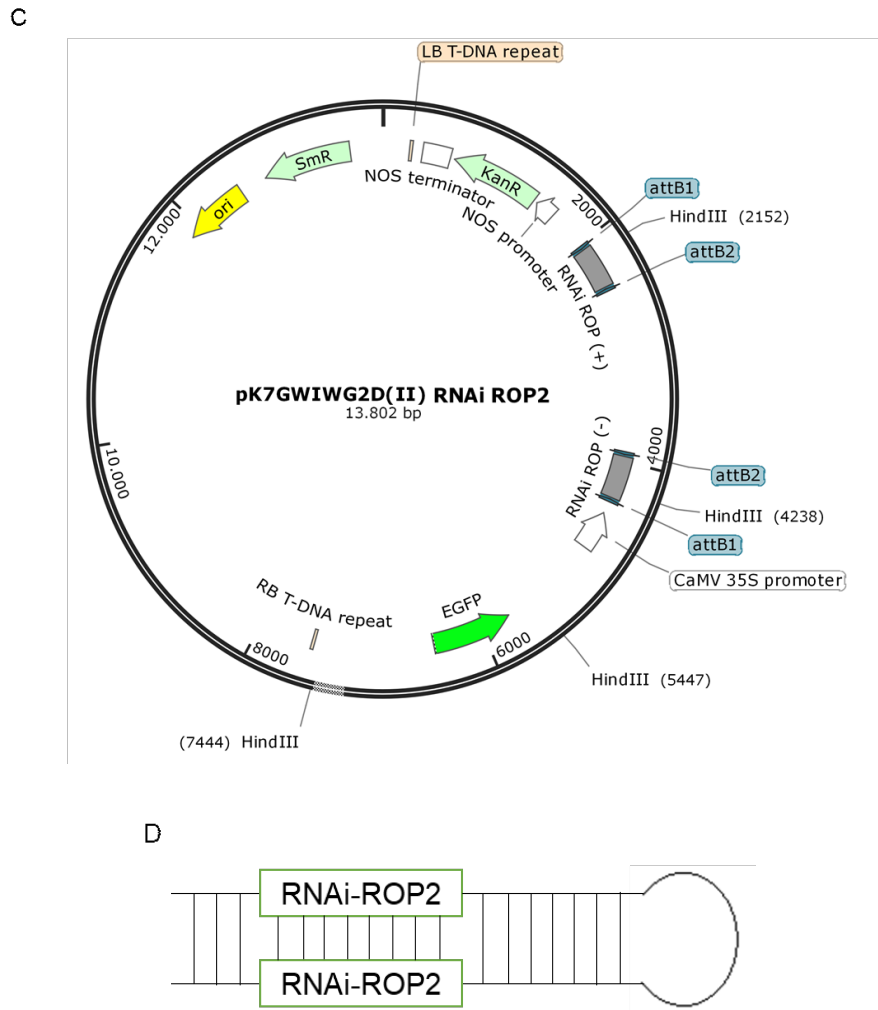


Figura 17. A) Esquema del vector pK7GWIWG2D(II), utilizado para expresar el fragmento del gen *Rop2* en plantas. El gen *ccdB* permite la selección negativa de las bacterias luego de la recombinación. B) Esquema de la recombinación sitio específica entre los plásmidos pENTR-RNAi ROP2 y pK7GWIWG2D(II) para generar la construcción pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2, que expresa un RNAi para generar el silenciamiento post-transcripcional del transcripto *ROP2*. Se esquematiza la región del T-DNA que es transferido e incorporado en el genoma de *M. truncatula*. RB y LB: bordes derecho e izquierdo del T-DNA respectivamente. C) Esquema del vector pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2. D) Esquema de la estructura de horquilla formada en el transcripto derivado de la expresión de la unidad transcripcional controlada por el promotor del virus de la coliflor 35S.

Luego, el resultado de la reacción de recombinación se utilizó para transformar células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Las células de *E. coli* transformadas se plaquearon en medio LB-agar conteniendo espectinomicina 50 $\mu\text{g/ml}$ como antibiótico para la selección de las células transformadas con el plásmido recombinante.

Para verificar la doble inserción del fragmento del gen *Rop2* en el vector de destino, se realizaron reacciones de *colony* PCR sobre tres de las colonias obtenidas. Se utilizaron el *primer* p35S (que amplifica sobre el vector pK7GWIWG2D(II)) y el *primer* RNAi *Rop2* reverso, y el *primer* KAN (que amplifica sobre el vector pK7GWIWG2D(II)) y el *primer* RNAi *Rop2* reverso en dos reacciones de PCR. Estas reacciones permiten no sólo constatar la presencia del inserto, sino también corroborar la correcta orientación de ambas inserciones. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa, comprobándose que el tamaño de las bandas obtenidas se correspondía con los tamaños esperados de 602 pb y 770 pb para cada uno de los pares de *primers*. Este resultado confirma la doble inserción del fragmento de *Rop2* en el vector de destino pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 en las tres colonias analizadas (Figura 18).

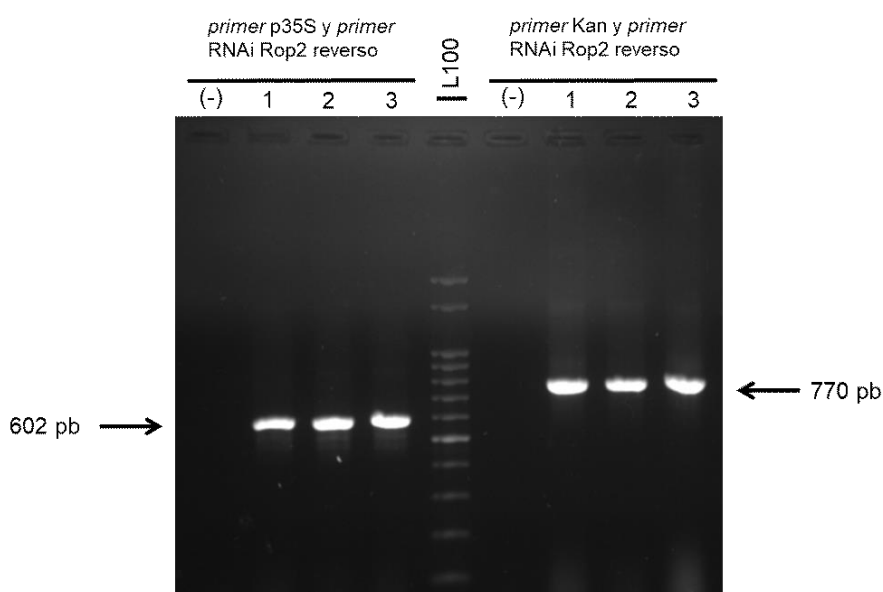


Figura 18. Verificación de la construcción pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2. Se realizó la recombinación entre pENTR-RNAi ROP2 y el vector destino pK7GWIWG2D(II), se transformaron células de *E. coli* y se analizaron tres colonias por *colony* PCR. Se utilizaron dos combinaciones de *primers* distintas: *primer* p35S y *primer* RNAi *Rop2* reverso; y *primer* KAN y *primer* RNAi *Rop2* reverso. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) donde se sembraron los productos de las reacciones de PCR realizadas a partir de tres colonias elegidas al azar (1 a 3). El control negativo (-) corresponde a una reacción de PCR en la cual no se adicionó bacteria para cada una de las reacciones de PCR. Como marcador de peso molecular se usó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

Posteriormente se realizó la purificación del plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 a partir de un cultivo líquido de la colonia 3. La presencia de ADN plasmídico se verificó por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 19).

Para comprobar que el vector purificado contenga la doble inserción, se realizó una digestión enzimática del vector pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 con la enzima de restricción *Hind*III. Es de esperar que esta digestión dé lugar a fragmentos de 8510, 2086, 1997 y 1209 pb, teniendo en cuenta que el gen *ccdB* (aproximadamente 700 pb) fue reemplazado por el fragmento ROP2 (375 pb). Paralelamente, se realizó la misma digestión con el vector pK7GWIWG2D(II) vacío como control, esperándose obtener fragmentos de 12887 y 1997 pb. La electroforesis en un gel de agarosa de los productos de la digestión mostró que los tamaños de las bandas observadas fueron los esperados, tanto en el vector vacío como en el recombinado (Figura 19). Por simplicidad, de aquí en adelante la construcción pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 obtenida se denominó RNAi-ROP2.

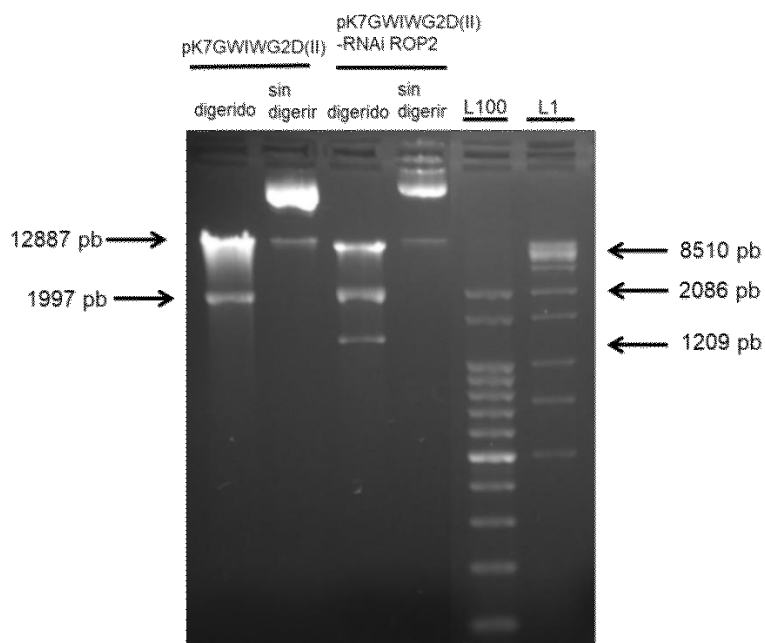


Figura 19. Purificación y análisis del vector pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2. Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) de una minipreparación de ADN plasmídico correspondiente al vector pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 obtenido a partir de la colonia 3, y de la digestión enzimática de los vectores pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 y pK7GWIWG2D(II) vacío con la enzima *Hind*III. Los tamaños de las bandas observadas concuerdan con los esperados. Como marcador de peso molecular se utilizó el *ladder* 100 pb (L100) y el *ladder* 1 Kb de PB-L (L1).

Una vez obtenida la construcción deseada, se procedió a transformar células de *A. rhizogenes* Arqua-1 electrocompetentes con el plásmido purificado, las cuales se hicieron crecer en medio LB-agar suplementado con espectinomicina 200 µg/ml como agente de selección. Se obtuvieron varias colonias, de las cuales se seleccionaron seis al azar para ser analizadas. Con el objetivo de verificar que estas colonias efectivamente portaran la construcción RNAi-ROP2, se realizó una reacción de *colony* PCR utilizando los *primers* específicos del fragmento RNAi Rop2 directo y RNAi Rop2 reverso (Tabla 8 de Materiales y métodos). Los productos de la reacción de *colony* PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 20). Se obtuvo una banda del tamaño esperado de 375 pb en todas las reacciones, por lo que todas las colonias de *A. rhizogenes* analizadas incorporaron el plásmido recombinado. Estas colonias se utilizaron posteriormente para la transformación de raíces de *M. truncatula*, como se detalla en la sección 2 de Resultados y discusión.

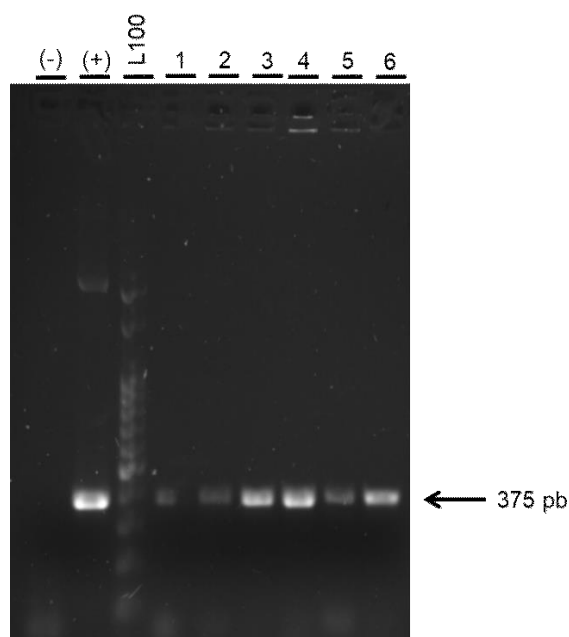


Figura 20. Transformación en *A. rhizogenes* Arqua-1 con la construcción RNAi-ROP2. Se transformó mediante electroporación el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi ROP2 purificado y las colonias resultantes se analizaron por *colony* PCR. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v), donde se sembraron los productos de las reacciones de PCR realizadas a partir de seis colonias elegidas al azar. El amplicón presentó el tamaño esperado de 375 pb en las seis colonias analizadas. El control negativo (-) corresponde a una reacción de PCR en la

cual no se adicionó bacteria a la mezcla de reacción de PCR, mientras que para el control positivo (+) se utilizó como molde el vector pENTR-RNAi ROP2 obtenido previamente. Como marcador de peso molecular se usó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

Los resultados presentados en esta sección confirman la obtención de la construcción RNAi-ROP2, diseñada para disminuir los niveles de mRNA de *Rop2* en raíces de *M. truncatula*. Como control se utilizó la construcción RNAi-GUS, que fue desarrollada previamente en el laboratorio. Cabe mencionar que el gen *uidA* no se encuentra presente en el genoma de la planta, por lo que es de esperar que la construcción RNAi-GUS no produzca silenciamiento de ningún transcripto. Esta estrategia permitirá luego analizar la función de la GTPasa monomérica ROP2 en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *M. truncatula* y *S. meliloti*.

2. Generación de plantas compuestas con niveles reducidos del transcripto *ROP2*

Se procedió a generar plantas compuestas de *M. truncatula* que expresen RNAi-ROP2, o bien plantas control transformadas con la construcción RNAi-GUS. Las plantas compuestas están formadas por una parte aérea sin transformar y raíces transgénicas que contienen la construcción de interés. Las construcciones RNAi-ROP2 y RNAi-GUS fueron introducidas en plantas de *M. truncatula* utilizando el método de transformación de raíces mediado por *A. rhizogenes* descrito previamente (Boisson-Dernier et al. 2001). Las plantas transformadas con el vector RNAi-ROP2 o con el vector RNAi-GUS se dejaron crecer en placas de Petri conteniendo medio agar-Fahraeus suplementado con kanamicina y nitrógeno, y luego fueron transferidas a cajas cuadradas conteniendo medio agar-Fahraeus sin nitrógeno.

Las raíces transformadas emergen desde el callo, por lo que éstas pueden distinguirse de las raíces no transformadas visualizándolas en un transiluminador de luz blanca. El porcentaje de plantas transformadas, definido como el porcentaje de plantas con al menos una raíz transgénica, fue del 38 % y 34 % para las plantas RNAi-ROP2 y RNAi-GUS, respectivamente.

3. Análisis del fenotipo asociado a la nodulación de las plantas RNAi-ROP2

Con el fin de estudiar la posible función de *Rop2* en la nodulación, las raíces de plantas compuestas transformadas con las construcciones RNAi-ROP2 y RNAi-GUS fueron inoculadas con *S. meliloti*. Posteriormente, se analizó la formación de nódulos en las plantas a diferentes tiempos post-inoculación. Para ello, en primer lugar, se determinó el porcentaje de plantas noduladas a los 21 días post-inoculación (dpi) con *S. meliloti*. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de plantas noduladas entre las plantas RNAi-ROP2 y las plantas control (Tabla 10).

Tabla 10. Número y porcentaje de plantas noduladas.

Plantas noduladas/plantas totales		% de plantas noduladas		
dpi	RNAi-ROP2	RNAi-GUS	RNAi-ROP2	RNAi-GUS
21	21/26	26/29	80.8	89.6

Sumado a esto, se cuantificó el número de nódulos formados por raíz transgénica a los 7, 10, 14 y 21 dpi. La cinética de nodulación reveló que las raíces transgénicas que expresan el RNAi-ROP2 presentaron un aumento estadísticamente significativo del número de nódulos por raíz respecto a las plantas control en todos los tiempos estudiados (Figura 21).

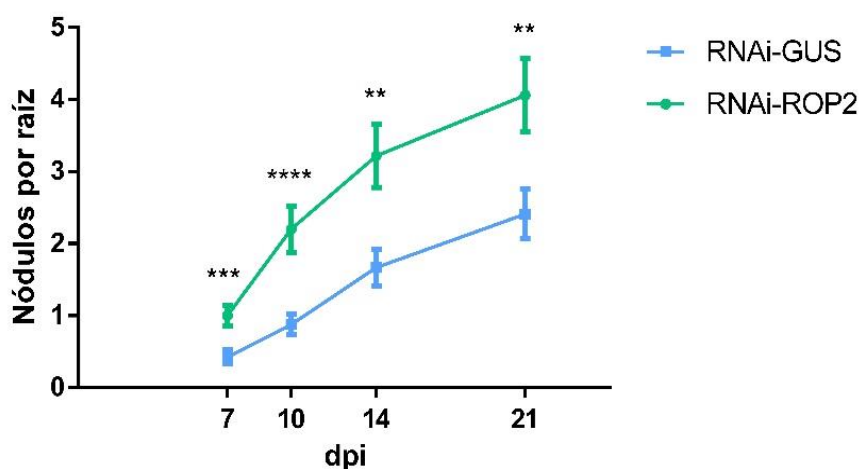


Figura 21. Cinética de nodulación. Número de nódulos formados en raíces de *M. truncatula* control RNAi-GUS (línea azul) y silenciadas RNAi-ROP2 (línea verde) cuantificados a los 7, 10,

14 y 21 dpi con *S. meliloti*. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0,0001$ (****) en un t-test no apareado entre las muestras RNAi-GUS y RNAi-ROP2.

Por otro lado, a los 21 dpi se realizó una distinción entre nódulos en base a su coloración, ya que los nódulos maduros expresan la leghemoglobina, una proteína que confiere color rosado, mientras que aquellos nódulos que no expresan dicha proteína permanecen blancos y no llevan adelante la fijación de nitrógeno. Se determinó la fracción de nódulos rosas y blancos respecto del total de nódulos. Los resultados muestran que la fracción de nódulos rosas fue significativamente mayor en las raíces RNAi-ROP2 que en las RNAi-GUS (Figura 22), sugiriendo que ROP2 actúa como un regulador negativo de la formación y maduración de los nódulos.

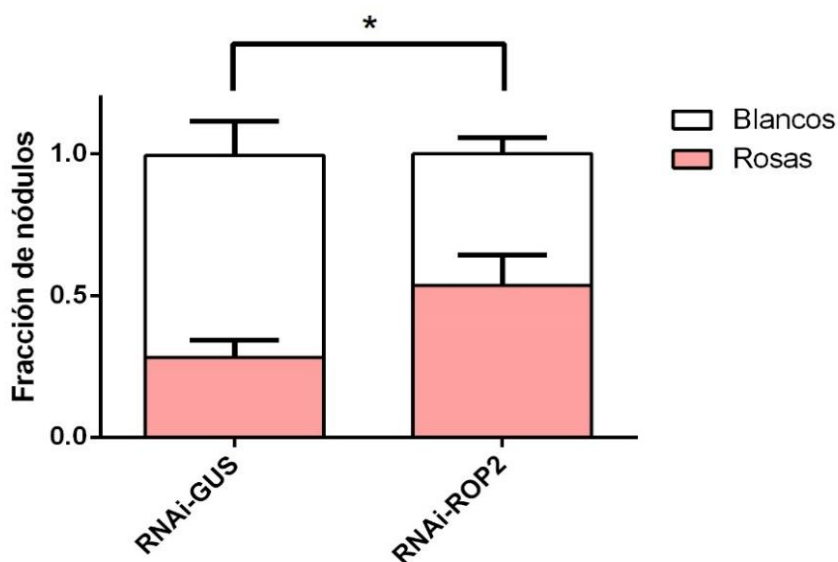


Figura 22. Fracción de nódulos rosas y blancos formados en raíces de *M. truncatula* control (RNAi-GUS) y silenciadas en RNAi-ROP2, determinada a los 21 dpi con *S. meliloti*. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0.05$ (*) en un t-test no apareado entre las muestras RNAi-GUS y RNAi-ROP2.

Además, a los 21 dpi también se determinó el tamaño de los nódulos formados en las raíces de las plantas silenciadas y control. El tamaño de los nódulos formados en las raíces RNAi-ROP2 fue significativamente mayor con respecto al control (Figura 23), lo cual es consistente con el efecto propuesto para ROP2 en la maduración de los nódulos.

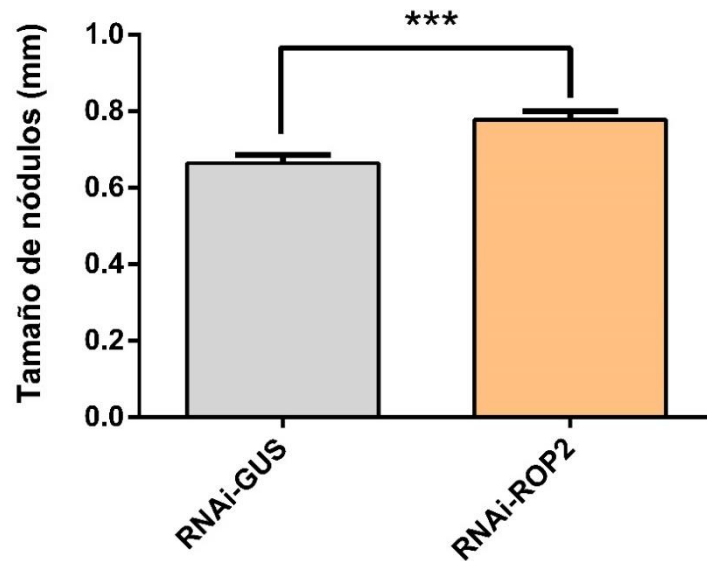


Figura 23. Tamaño de nódulos formados en raíces de *M. truncatula* RNAi-GUS y RNAi-ROP2 determinado a los 21 dpi. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0.001$ (***) en un t-test no apareado entre las muestras RNAi-GUS y RNAi-ROP2.

Nuestros resultados indican que el silenciamiento post-transcripcional de *Rop2* afecta positivamente tanto el número y el tamaño de nódulos formados en respuesta a la infección con *S. meliloti*, como la fracción de nódulos que expresan leghemoglobina, sugiriendo que ROP2 actúa como un regulador negativo de la organogénesis y del desarrollo de los nódulos.

Sección 2

1. Análisis del patrón de expresión de *Rop2* en diferentes órganos y condiciones

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de *Rop2* en distintos órganos y condiciones en plantas de *M. truncatula*, se realizó una transcripción reversa seguida de una PCR cuantitativa (RT-qPCR) del transcripto *ROP2*. Para esto, se recolectó tejido de raíces, tallo y hojas a partir de plantas *wild-type* de 14 días, en dos réplicas biológicas independientes. Por otro lado, también se recolectó tejido de raíces de plantas *wild-type* a las 24 y 48 horas post-inoculación (hpi) con *S. meliloti* (Sm), tratadas con la auxina ácido indol acético (IAA), o con agua como control (mock). A partir de estas muestras de tejido se realizó la extracción de ARN total. Los ARNs obtenidos se analizaron en un gel de agarosa para evaluar su integridad (Figura 24).

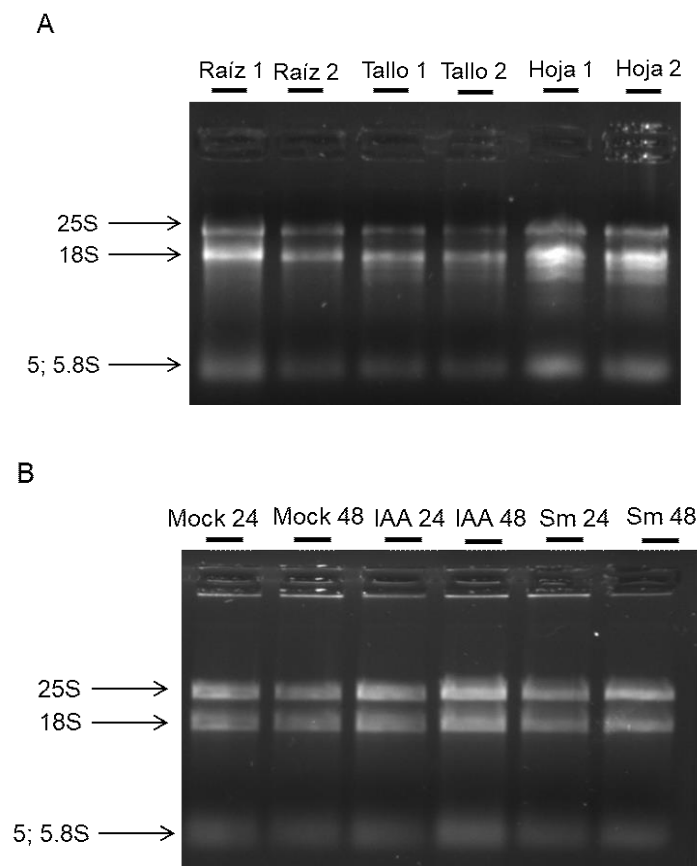


Figura 24. Extracción de ARN total. A) Se extrajo ARN total a partir de tejido de raíz, tallo y hoja de plantas *wild-type* de dos semanas de crecimiento. B) Se extrajo ARN total a partir de tejido de

raíces de plantas *wild-type* a 24 y 48 hpi con *S. meliloti* (Sm), tratadas con auxinas (IAA) o con agua (mock). Las muestras de ARN total se corrieron en un gel de agarosa 1 % (p/v) no desnaturalizante. Las bandas corresponden a los ARN ribosomales (rRNAs) de plantas, 25S, 18S, 5.8S y 5S.

Posteriormente, las muestras de ARN obtenidas se trataron con DNAsa libre de RNAsa para digerir el ADN genómico que pudiera estar presente. La ausencia de ADN genómico contaminante en las muestras de ARN se verificó mediante una reacción de PCR utilizando *primers* HIS3L directo y reverso, correspondientes al gen *HISTONE 3 LIKE* de *M. truncatula* (Tabla 8 de Materiales y métodos). Los productos de la reacción de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa, donde se observó una banda de 220 pb en el control positivo, pero en ninguna de las muestras de ARN se observó amplificación, indicando que luego de la digestión las mismas no contienen ADN genómico (Figura 25).

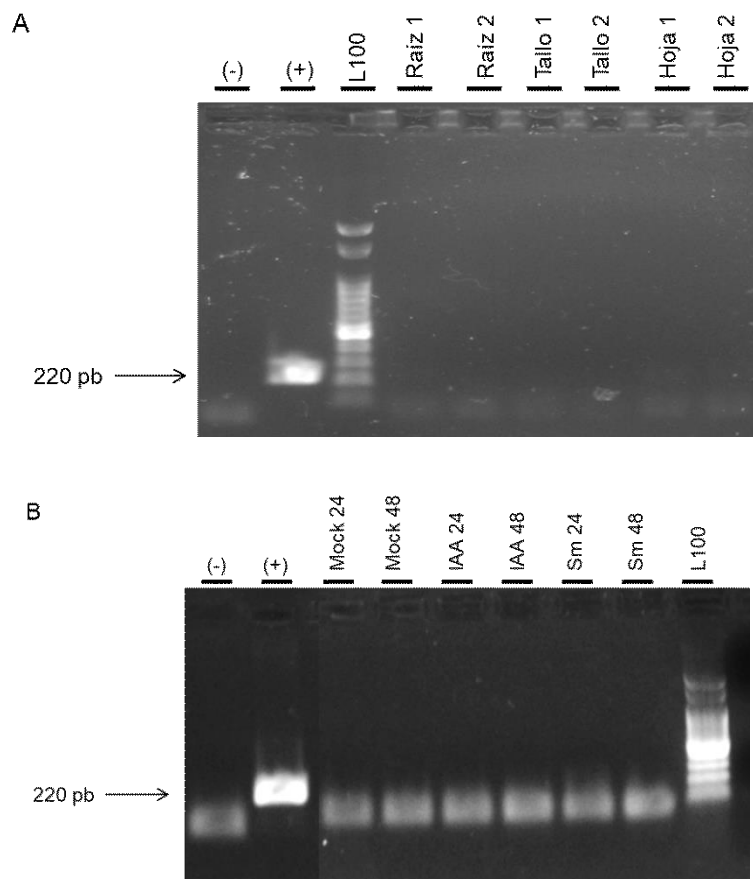
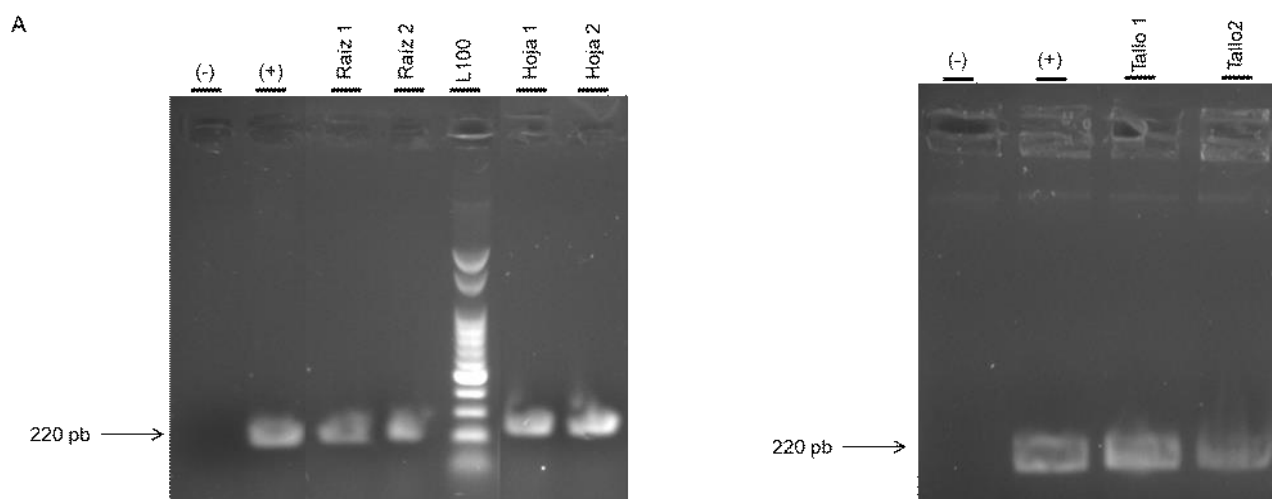


Figura 25. Verificación de la ausencia de contaminación con ADN genómico en el ARN. Se realizó una reacción de PCR sobre las muestras de ARN de raíz, tallo y hoja (A), o ARN de raíces

inoculadas con *S. meliloti* (Sm), tratadas con auxinas (IAA), o con agua (mock) (B) utilizando *primers* correspondientes al gen *HISTONE 3 LIKE*. Los productos de amplificación se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v). No se detectó el fragmento *Histona 3* (220 pb) en ninguna de las muestras. Se utilizó un control negativo (-) en el que no se agregó ARN a la mezcla de reacción de PCR, y un control positivo (+) en el que se utilizó como molde ADN genómico de *M. truncatula* disponible en el laboratorio. Como marcador de peso molecular se usó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

A partir de las muestras de ARN libres de ADN genómico, se llevó a cabo la síntesis de la primera cadena de cDNA utilizando oligodT y la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega). Para verificar la síntesis de cDNA y estimar la concentración de los cDNAs sintetizados, se realizó una reacción de PCR semi-cuantitativa utilizando los *primers* HIS3L directo y reverso, correspondientes al gen *HISTONE 3 LIKE* de *M. truncatula* (Tabla 8 de Materiales y métodos). Los productos de la reacción de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa. En todos los casos se obtuvo un fragmento correspondiente al tamaño esperado, de aproximadamente 220 pb (Figura 26). Este resultado muestra que la reacción de transcripción reversa generó la síntesis de la primera cadena de cDNA. Para utilizar posteriormente estas muestras de cDNA en reacciones de qPCR, se realizó una dilución 1/100 de las mismas con agua estéril.



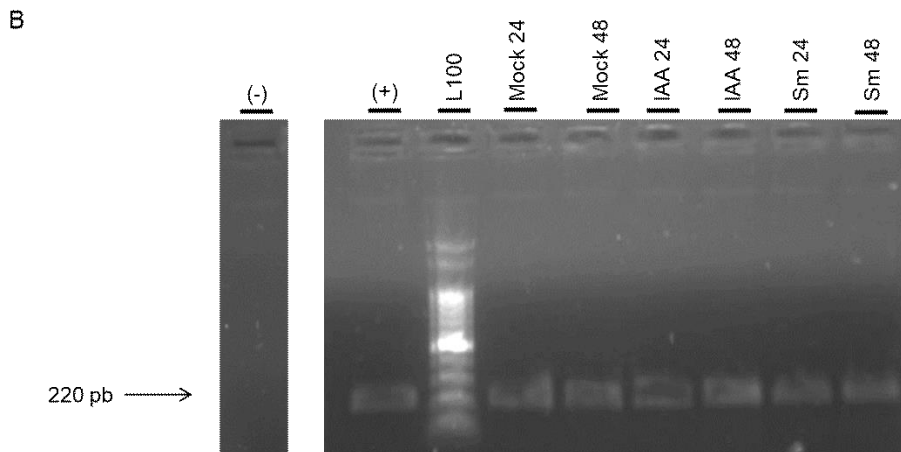


Figura 26. Verificación de la síntesis de cDNA. Se realizó una reacción de PCR semi-cuantitativa de las muestras de cDNA de raíz, tallo y hoja (A), o cDNA de raíces inoculadas con *S. meliloti* (Sm), tratadas con auxinas (IAA), o con agua (mock) (B) utilizando *primers* correspondientes al gen *HISTONE 3 LIKE*. Los productos de amplificación se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v). Las bandas obtenidas corresponden al fragmento *Histona 3* (220 pb) amplificado a partir de cDNA. Se utilizó un control negativo (-) de la reacción de PCR en el que no se agregó cDNA a la mezcla de reacción, y un control positivo (+) en el que se utilizó como molde ADN genómico de *M. truncatula* disponible en el laboratorio. Como marcador de peso molecular se usó el *ladder* 100 pb de PB-L (L100).

A partir de las muestras de cDNA y los *primers* específicos del fragmento RNAi Rop2 directo y RNAi Rop2 reverso (Tabla 8 de Materiales y métodos), se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real (RT-qPCR) con el fin de cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica para la proteína ROP2.

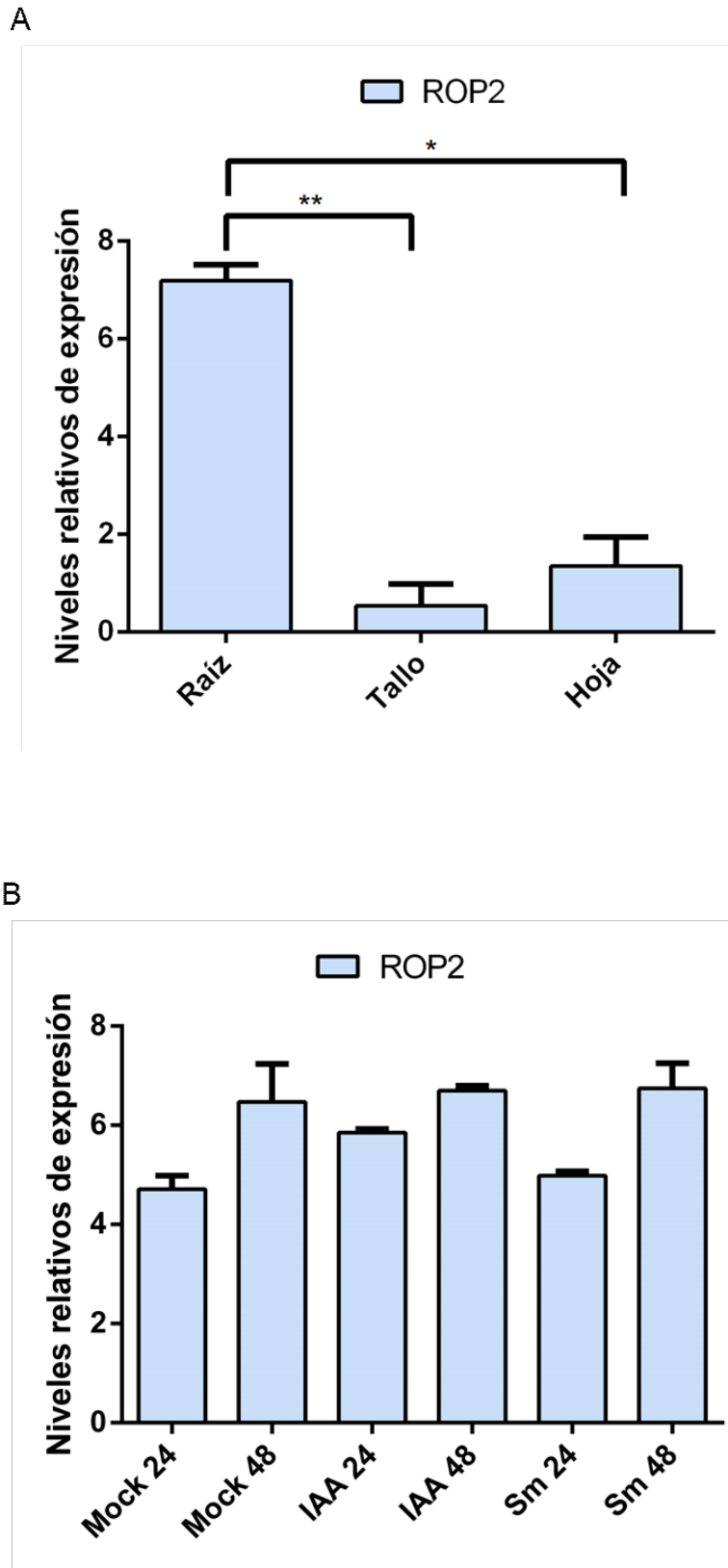


Figura 27. Determinación por RT-qPCR de los niveles de expresión de *Rop2* en raíz, tallo y hoja de *M. truncatula* (A), o raíces de 24 y 48 hpi con *S. meliloti* (Sm), tratadas con auxinas (IAA) o con agua (mock) (B). Se representa la media y el error estándar de la media de los valores

obtenidos. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron por los valores del transcripto *HISTONE 3 LIKE (HIS3L)* de *M. truncatula*. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) en un t-test no apareado entre las muestras.

Los resultados obtenidos a partir de la reacción de PCR cuantitativa muestran que el gen *Rop2* se expresa en los tres tejidos estudiados, aunque los niveles de mRNA fueron mucho mayores en raíces que en hoja y tallo, donde se observaron muy bajos niveles de expresión (Figura 27A). Por otro lado, no se observaron grandes diferencias en los niveles de *ROP2* en plantas inoculadas o tratadas con auxinas respecto al control tratado con agua (Figura 27B).

Estos resultados sugieren que existe una diferencia en el patrón de expresión de *Rop2* en los distintos órganos de la planta analizados, por lo que esta proteína podría cumplir funciones específicas en la raíz. En cuanto al proceso de nodulación y el tratamiento con auxinas, no se observó un aumento en la acumulación relativa de transcritos de *Rop2* en las raíces. Teniendo en cuenta estos resultados, el gen *Rop2* parece no ser regulado a nivel de acumulación de sus transcritos en respuesta a estos tratamientos. Sin embargo, este resultado está limitado a los dos tiempos medidos y a la concentración de auxina seleccionada para el tratamiento.

Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos permiten concluir que la expresión de RNAi-ROP2 afecta la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula*, tanto en número como en tamaño, evidenciando un importante rol de esta proteína en el desarrollo de nódulos en etapas tempranas de la simbiosis.

A partir del análisis de expresión del gen *Rop2*, podemos concluir que existen diferencias significativas en su expresión en los diferentes órganos de la planta, siendo mucho mayor en raíz, menos abundante en hoja y prácticamente nula en tallo, por lo que esta proteína podría cumplir funciones específicas en la raíz. La falta de una respuesta diferencial en la acumulación relativa de transcritos de *ROP2* frente al tratamiento de raíces con auxinas o luego de la inoculación con rizobio sugiere que la posible respuesta de *Rop2* a estos tratamientos debería estar mediada a nivel traduccional o post-traduccional, ya sea por su regulación por asociación a nucleótidos de guanosina o por su relocalización en membranas. Este tipo de mecanismos permiten una rápida respuesta al estímulo, porque no necesitan utilizar la maquinaria transcripcional o traduccional para su ejecución.

Como perspectiva sería interesante determinar los niveles de expresión de otros genes de respuesta temprana a auxinas, como los genes *Aux/IAA* (*Auxin/Indole-3-acetic acid*) o *SAUR* (*Small Auxin Up RNA*), para corroborar que el tratamiento realizado haya funcionado correctamente y que la planta esté censando la auxina exógena (Garay-Arroyo et al. 2014). De la misma manera, podrían medirse los genes de respuesta temprana al rizobio como *NIN* y *ERN1*, para corroborar que la inoculación de las plantas haya funcionado correctamente y estas estén respondiendo molecularmente al tratamiento.

Estos experimentos constituyen una primera aproximación para estudiar el rol que cumple la proteína ROP2 en los procesos de infección y organogénesis del nódulo. Es por esto que como perspectivas futuras se propone realizar nuevas replicas biológicas de los experimentos, y confirmar el silenciamiento a partir de la determinación del patrón de expresión de *Rop2* mediante RT-qPCR en plantas silenciadas y control. Sumado a esto, sería interesante diseñar otra construcción de RNAi dirigido a otra región del gen *Rop2* para respaldar nuestros resultados. Teniendo en cuenta el alto grado de conservación de los miembros

de la familia ROP, esto solamente sería posible utilizando la secuencia 5' no traducida de *Rop2*, ya que las regiones UTR poseen un mayor grado de especificidad. Alternativamente podrían utilizarse otras técnicas como un artificial miRNA para reducir los niveles de transcripto o una edición génica para mutar el gen *Rop2* utilizando la técnica de CRISPR/Cas.

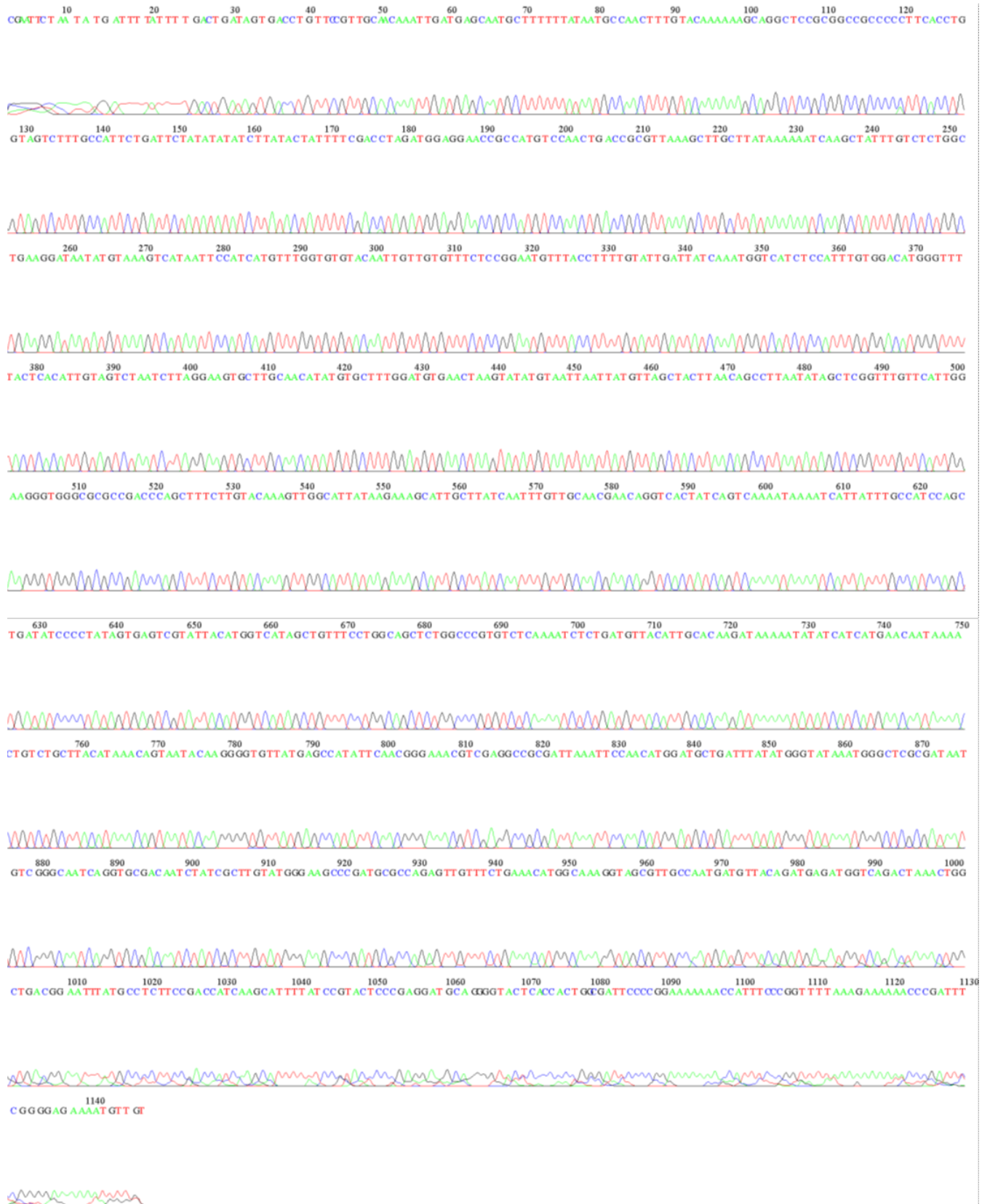
Las raíces silenciadas por RNAi también podrían utilizarse para realizar un análisis de la formación y progresión de los hilos de infección con el fin de establecer una relación entre el fenotipo de organogénesis del nódulo y el de infección rizobiana. También se podría complementar la caracterización fenotípica por medio de experimentos en donde se sobreexpresen versiones constitutivamente activas o dominantes negativas de ROP2 obtenidas por mutaciones puntuales que modifiquen los dominios regulatorios de la proteína.

El patrón de expresión espacio-temporal de *Rop2* podría complementarse utilizando genes reporteros bajo el control del promotor de este gen. Además, para profundizar la caracterización funcional de esta GTPasa, resulta atractivo determinar la localización subcelular de ROP2 en raíces de *M. truncatula* usando fusiones traduccionales con proteínas fluorescentes, y de esta manera observar por microscopia como se distribuye espacialmente ROP2 durante los eventos de infección. Algunos de estos experimentos fueron iniciados durante el Trabajo final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Lic. María Eugenia Bozza.

La continuación del estudio de *Rop2* en el contexto de la nodulación podrá aportar información valiosa que permita ampliar nuestro conocimiento sobre los procesos moleculares implicados en la interacción de rizobios con leguminosas.

Material suplementario

Anexo 1. Secuenciación del fragmento *Rop2* en el vector pENTR/D-TOPO utilizando *primer* M13 directo.



Bibliografía

- Baudin, Maël et al. 2015. "A Phylogenetically Conserved Group of Nuclear Factor-Y Transcription Factors Interact to Control Nodulation in Legumes." *Plant Physiology*.
- Benedito, Vagner A. et al. 2008. "A Gene Expression Atlas of the Model Legume *Medicago Truncatula*." *Plant Journal*.
- Blanco, Flavio Antonio, Eitel Peltzer Meschini, María Eugenia Zanetti, and O. Mario Aguilar. 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*.
- Boisson-Dernier, Aurélien et al. 2001. "Agrobacterium Rhizogenes-Transformed Roots of *Medicago Truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations." *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Breakspear, Andrew et al. 2014. "The Root Hair 'Infectome' of *Medicago Truncatula* Uncovers Changes in Cell Cycle Genes and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection." *Plant Cell*.
- Canfield, Donald E., Alexander N. Glazer, and Paul G. Falkowski. 2010. "The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle." *Science*.
- Cerri, Marion R. et al. 2012. "Medicago Truncatula ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection." *Plant Physiology*.
- Ehrhardt, David W., Rebecca Wais, and Sharon R. Long. 1996. "Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to Rhizobium Modulation Signals." *Cell*.
- Endre, Gabriella et al. 2002. "A Receptor Kinase Gene Regulating Symbiotic Nodule Development." *Nature*.
- Flores, Ana Claudia et al. 2018. "Comparative Phylogenetic and Expression Analysis of Small GTPases Families in Legume and Non-Legume Plants." *Plant Signaling and Behavior* 13(2).

- Foyer, Christine H. et al. 2016. "Neglecting Legumes Has Compromised Human Health and Sustainable Food Production." *Nature Plants*.
- Galibert, F. et al. 2001. "The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium Meliloti*." *Science*.
- Garay-Arroyo, Adriana et al. 2014. "La Homeostasis de Las Auxinas y Su Importancia En El Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*." 33: 13–22.
- Gepts, Paul et al. 2005. "Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference." In *Plant Physiology*.
- Geurts, René, Elena Fedorova, and Ton Bisseling. 2005. "Nod Factor Signaling Genes and Their Function in the Early Stages of *Rhizobium* Infection." *Current Opinion in Plant Biology*.
- Gleason, Cynthia et al. 2006. "Nodulation Independent of *Rhizobia* Induced by a Calcium-Activated Kinase Lacking Autoinhibition." *Nature*.
- Graham, Peter H., and Carroll P. Vance. 2003. "Legumes: Importance and Constraints to Greater Use." *Plant Physiology*.
- Gruber, Nicolas, and James N. Galloway. 2008. "An Earth-System Perspective of the Global Nitrogen Cycle." *Nature*.
- Hobecker, Karen Vanesa et al. 2017. "The MicroRNA390/TAS3 Pathway Mediates Symbiotic Nodulation and Lateral Root Growth." *Plant Physiology*.
- Imin, Nijat, Nicolas Goffard, Mahira Nizamidin, and Barry G. Rolfe. 2008. "Genome-Wide Transcriptional Analysis of Super-Embryogenic *Medicago Truncatula* Explant Cultures." *BMC Plant Biology*.
- Journet, Etienne-Pascal et al. 2006. "Rhizobial Inoculation and Nodulation of *Medicago Truncatula*."
- Ke, Danxia et al. 2012. "The Small GTPase ROP6 Interacts with NFR5 and Is Involved in Nodule Formation in *Lotus Japonicus*." *Plant Physiology*.

- Kiirika, Leonard Muriithi et al. 2012. "Silencing of the Rac1 GTPase MtRoP9 in Medicago Truncatula Stimulates Early Mycorrhizal and Oomycete Root Colonizations but Negatively Affects Rhizobial Infection." *Plant Physiology*.
- Kondorosi, Eva, and Adam Kondorosi. 2004. "Endoreduplication and Activation of the Anaphase-Promoting Complex during Symbiotic Cell Development." In *FEBS Letters*,.
- Landy, A. 1989. "Dynamic, Structural, And Regulatory Aspects Of Lambda-Site-Specific Recombination." *Annual Review of Biochemistry*.
- Lee, Angie, Michelle R. Lum, and Ann M. Hirsch. 2007. "ENOD40 Gene Expression and Cytokinin Responses in the Nonnodulating, Nonmycorrhizal (Nod-Myc-) Mutant, Masym3, of Medicago Alba Desr." *Plant Signaling and Behavior*.
- Lei, Ming Juan et al. 2015. "The Small Gtpase ROP10 of Medicago Truncatula Is Required for Both Tip Growth of Root Hairs and Nod Factor-Induced Root Hair Deformation." *Plant Cell*.
- Limpens, Erik et al. 2009. "Medicago N2-Fixing Symbiosomes Acquire the Endocytic Identity Marker Rab7 but Delay the Acquisition of Vacuolar Identity." *Plant Cell*.
- Limpens, Erik, and Ton Bisseling. 2003. "Signaling in Symbiosis." *Current Opinion in Plant Biology*.
- Liu, Wei et al. 2010. "Characterization and Expression Analysis of Medicago Truncatula ROP GTPase Family during the Early Stage of Symbiosis." *Journal of Integrative Plant Biology*.
- Messinese, Elsa et al. 2007. "A Novel Nuclear Protein Interacts with the Symbiotic DMI3 Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase of Medicago Truncatula." *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Middleton, Patrick H. et al. 2007. "An ERF Transcription Factor in Medicago Truncatula That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction." *Plant Cell*.

- Oldroyd, Giles E.D., and J. Allan Downie. 2008. "Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes." *Annual Review of Plant Biology* 59(1): 519–46.
- Oldroyd, Giles E.D., Jeremy D. Murray, Philip S. Poole, and J. Allan Downie. 2011. "The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis." *Annual Review of Genetics*.
- Oldroyd, Giles E D. 2013. "Speak, Friend, and Enter: Signalling Systems That Promote Beneficial Symbiotic Associations in Plants." *Nature Reviews Microbiology*.
- Pecrix, Yann et al. 2018. "Whole-Genome Landscape of *Medicago Truncatula* Symbiotic Genes." *Nature Plants*.
- Pereira-Leal, José B., and Miguel C. Seabra. 2001. "Evolution of the Rab Family of Small GTP-Binding Proteins." *Journal of Molecular Biology*.
- Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton. 2000. "Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Pislariu, Catalina I. et al. 2012. "A *Medicago Truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation." *Plant Physiology*.
- Radutoiu, Simona et al. 2003. "Plant Recognition of Symbiotic Bacteria Requires Two LysM Receptor-like Kinases." *Nature*.
- Relić, B. et al. 1994. "Nod Factors of *Rhizobium* Are a Key to the Legume Door." *Molecular Microbiology*.
- Rivero, Claudio, Soledad Traubenik, María Eugenia Zanetti, and Flavio Antonio Blanco. 2019. "Small GTPases in Plant Biotic Interactions." *Small GTPases*.
- Robertson, G. Philip, and Peter M. Vitousek. 2009. "Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource." *Annual Review of Environment and Resources*.
- Roth, L. E., and G. Stacey. 1989. "Bacterium Release into Host Cells of

- Nitrogen-Fixing Soybean Nodules: The Symbiosome Membrane Comes from Three Sources." *European journal of cell biology*.
- Schepetilnikov, Mikhail et al. 2017. "GTP Ase ROP 2 Binds and Promotes Activation of Target of Rapamycin, TOR , in Response to Auxin ." *The EMBO Journal*.
- Schepetilnikov, Mikhail, and Lyubov A. Ryabova. 2017. "Auxin Signaling in Regulation of Plant Translation Reinitiation." *Frontiers in Plant Science*.
- Shuman, S. 1994. "Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase." *Journal of Biological Chemistry*.
- Shuman, S. 1991. "Site-Specific Interaction of Vaccinia Virus Topoisomerase I with Duplex DNA. Minimal DNA Substrate for Strand Cleavage in Vitro [Published Erratum Appears in J Biol Chem 1991 Oct 25;266(30):20576-7]." *Journal of Biological Chemistry*.
- Sieberer, Björn J. et al. 2009. "A Nuclear-Targeted Cameleon Demonstrates Intranuclear Ca²⁺ Spiking in Medicago Truncatula Root Hairs in Response to Rhizobial Nodulation Factors." *Plant Physiology*.
- Singh, Sylvia et al. 2014. "CYCLOPS, A DNA-Binding Transcriptional Activator, Orchestrates Symbiotic Root Nodule Development." *Cell Host and Microbe*.
- Stracke, Silke et al. 2002. "A Plant Receptor-like Kinase Required for Both Bacterial and Fungal Symbiosis." *Nature*.
- Takai, Yoshimi, Takuya Sasaki, and Takashi Matozaki. 2001. "Small GTP-Binding Proteins." *Physiological Reviews*.
- Tan, Ying Cai et al. 2002. "Characterization of the Interactions between the Small GTPase RhoA and Its Guanine Nucleotide Exchange Factors." *Analytical Biochemistry*.
- Tao, Li Zhen, Alice Y. Cheung, and Hen Ming Wu. 2002. "Plant Rac-like GTPases Are Activated by Auxin and Mediate Auxin-Responsive Gene Expression." *Plant Cell*.

- Tirichine, Leïla et al. 2006. "Deregulation of a Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase Leads to Spontaneous Nodule Development." *Nature*.
- Vernié, Tatiana et al. 2015. "The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root." *Plant Cell*.
- Vernoud, Vanessa, Amy C. Horton, Zhenbiao Yang, and Erik Nielsen. 2003. "Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis." *Plant Physiology*.
- Yalovsky, Shaul. 2015. "Protein Lipid Modifications and the Regulation of ROP GTPase Function." *Journal of Experimental Botany*.
- Young, Nevin D. et al. 2011. "The *Medicago* Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses." *Nature*.
- Zanetti, María Eugenia et al. 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*.
- Zheng, Z. L., and Z. Yang. 2000. "The Rop GTPase: An Emerging Signaling Switch in Plants." *Plant Molecular Biology*.
- Zumft, W. G., and L. E. Mortenson. 1975. "The Nitrogen-Fixing Complex of Bacteria." *BBA Reviews On Bioenergetics*.