



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral: Estudio funcional de genes involucrados en la simbiosis fijadora de nitrógeno***

---

***Tesista: Lic. Carla Roda***

***Director/a: Dr. Flavio A. Blanco***

***Año: 2022***



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

*Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias  
Exactas*

***“Estudio funcional de genes involucrados en la  
simbiosis fijadora de nitrógeno”***

Lic. Carla Roda

Director: Dr. Flavio A. Blanco



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

*A mi familia*  
*Paulina y Juan*

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Flavio Blanco por la dirección de este trabajo, por su dedicación para formarme como profesional y principalmente por su calidad humana. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. María Eugenia Zanetti por sus aportes e interés en mi proyecto de investigación y formación.

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

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

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a CONICET por haberme otorgado las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Federico Ariel del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (Santa Fe), por su ayuda en el presente trabajo y sus aportes en mi formación.

A los CPAs, investigadores y becarios del IBBM, por sus aportes al trabajo de investigación y en el trabajo diario dentro del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por todos los buenos momentos compartidos, por el apoyo y la compañía de todos estos años: Soledad, Karen, Cristina, Milagros, Carolina G, Ana Claudia, Mauricio, Joaquín, Claudio, Efren, Marcos, Carolina R., Melisse, Agustín, Jennifer, Andrés, Marianela y Marina.

A mi hija Paulina la luz de mis ojos, mi motivación. Gracias por llenar de alegría mis días.

A Juan por su incondicional compañía, su enorme paciencia y amor. A su familia, Ana y Florentina.

A mis padres Lucía y Guido, por su inmenso cariño, por su apoyo y por la fuerza que me dieron para alcanzar este gran logro.

A mis hermanos Bruno, Lino y Clara por su apoyo, compañía y amor. A mis cuñados Laura y Hernán, por sus consejos y cariño.

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

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1. Las leguminosas y la fijación biológica de nitrógeno.....	12
2. <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	155
3. Simbiosis fijadora de Nitrógeno.....	16
3.1. Asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios.....	16
3.2. Proceso de infección y organogénesis del nódulo .....	17
3.3. Vía de señalización de la nodulación .....	20
4. Funciones de los factores de transcripción NF-Y y SIN1 en la nodulación .....	24
5. Asociación simbiótica preferencial entre <i>P. vulgaris</i> y <i>R. etli</i> .....	28
6. Moléculas de señalización involucradas en las respuestas específicas de cepa .....	31
7. Vía de metilación del DNA dirigida por RNA.....	33
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
1. Hipótesis de trabajo y objetivo general .....	39
2. Objetivos específicos .....	40
<b>CAPÍTULO I: Análisis funcional del gen <i>PvIDN2</i>, involucrado en la vía de metilación del DNA dirigida por RNA</b> .....	<b>41</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
1. Análisis filogenético de la familia de proteínas con dominio XH/XS de <i>A. thaliana</i> y <i>P. vulgaris</i> .....	42
2. Análisis de la expresión de <i>PvIDN2</i> durante el desarrollo de nódulos y raíces .....	42
3. Obtención de plantas compuestas con niveles reducidos de <i>PvIDN2</i> .....	46

4. Evaluación del efecto del silenciamiento de <i>PvIDN2</i> sobre la arquitectura de raíz, la organogénesis del nódulo y la infección por <i>R. etli</i> .....	47
5. El silenciamiento de <i>PvIDN2</i> no altera los niveles de transcritos de los genes de respuesta temprana <i>ENOD40</i> y <i>ERN1</i> .....	49
6. Caracterización de los cambios en el estado de la metilación del DNA en plantas <i>PvIDN2</i> RNAi.....	51
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO II: Caracterización funcional de la ciclina P, un target transcripcional directo de <i>NF-YC1</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
1. Análisis filogenético de la familia de ciclinas de <i>P. vulgaris</i> .....	59
1.1. Identificación de los genes de ciclina en <i>P. vulgaris</i> .....	59
1.2. Análisis Filogenético y clasificación de los genes ciclina de <i>P. vulgaris</i> .....	60
2. Patrones de expresión de las ciclinas de <i>P. vulgaris</i> .....	62
3. Análisis de la expresión espacio-temporal del gen <i>PvCYCP4-1</i> durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno en raíces y nódulos de <i>P. vulgaris</i> .....	65
4. Caracterización funcional de <i>PvCYCP4-1</i> .....	69
4.1. Silenciamiento génico postranscripcional de <i>PvCYCP4-1</i> .....	69
4.2. Efecto del silenciamiento de <i>PvCYCP4-1</i> en la arquitectura de la raíz.....	72
4.3. <i>PvCYCP4-1</i> es requerido para la organogénesis del nódulo.....	73
4.4. <i>PvCYCP4-1</i> es requerido para la infección por rizobios.....	74
5. Impacto del silenciamiento de <i>PvCYCP4-1</i> sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular .....	75
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>78</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>82</b>
1. Material biológico .....	83
1.1. Material vegetal .....	83
1.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	83
2. Medios de cultivo y soluciones.....	84

2.1. Medio de cultivo para <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> .....	84
2.2. Medio de cultivo para rizobios.....	84
2.3. Medio Fahraeus.....	85
2.4. Medio de preservación de microorganismos .....	86
2.5. Antibióticos .....	86
3. Vectores de clonado .....	86
4. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico .....	87
4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	87
4.2. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa .....	88
4.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	88
4.4. Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY .....	89
4.5. Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y TOP10 electrocompetentes.....	90
4.6. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y TOP10 electrocompetentes.....	91
4.7. Minipreparación de DNA plasmídico .....	91
5. Generación de plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i> .....	91
5.1. Preparación de células de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 electrocompetentes	91
5.2. Transformación de células de <i>A. rhizogenes</i> K599 electrocompetentes.....	92
5.3. Esterilización y germinación de semillas.....	93
5.4. Crecimiento de plántulas .....	93
5.5. Transformación de raíces de <i>P. vulgaris</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i> K599 .....	93
5.6. Inoculación de las raíces de <i>P. vulgaris</i> con <i>R. etli</i> .....	94
6. Caracterización fenotípica de plantas compuestas .....	95
6.1. Análisis de eventos de infección (ITs) .....	95
6.2. Cuantificación del número y tamaño de los nódulos .....	95
6.3. Cuantificación de la longitud de las raíces .....	96
7. Métodos para la extracción, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos .....	97
7.1. Extracción de DNA genómico.....	97

7.2. Extracción de RNA total.....	97
7.3. Tratamiento con DNAsa .....	98
7.4. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa .....	99
7.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	99
8. Análisis Bioinformáticos.....	100
8.1. Análisis general de secuencias y diseño de <i>primers</i> .....	100
8.2. Bases de datos de secuencias genómicas .....	100
8.3. Base de datos de expresión .....	100
8.4. BLAST .....	100
8.5. Alineamiento de secuencias de proteínas .....	101
8.6. Alineamiento filogenético .....	101
9. Observaciones macrocópicas y microscópicas .....	101
10. Inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP).....	102
10.1. Preparación de la muestra .....	102
10.2. Extracción de DNA utilizando CTAB .....	102
10.3. Sonicación del DNA .....	103
10.4. Inmunoprecipitación .....	103
10.5. Lavado .....	104
10.6. Reverse Crosslink y purificación del DNA.....	104
<b>ANEXO .....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>107</b>

## RESUMEN

Las leguminosas son capaces de establecer una simbiosis con bacterias que convierten el nitrógeno atmosférico a formas utilizables para la planta. Esta fijación de nitrógeno ocurre en órganos postembrionarios formados en la raíz llamados nódulos. El establecimiento de esta simbiosis involucra la participación de mecanismos de señalización que derivan en la activación de diferentes factores de transcripción. Los miembros de la familia del factor nuclear Y (NF-Y) se han implicado en diferentes etapas de la simbiosis del nódulo de la raíz. Anteriormente hemos demostrado que NF-YA1 y NF-YC1 juegan un papel crucial durante la nodulación, modulando la expresión de los genes del ciclo celular de transición G2/M en poroto (*Phaseolus vulgaris*). Un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguido de PCR mostró un enriquecimiento de la región del promotor de una ciclina P en raíces que expresan FLAG-NF-YC1 en comparación con las raíces transformadas con el vector vacío, lo que sugiere que *PvNF-YC1* se une directamente a esta región promotora y podría modular su expresión. El gen ortólogo de *M. truncatula* codifica para una ciclina tipo P4 que se expresa principalmente en la zona meristemática del nódulo y podría estar implicado en la reactivación del ciclo celular que inicia la organogénesis del nódulo. En el presente trabajo de tesis, para dilucidar la función biológica del gen *PvCYCP4-1* en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno, se utilizó una estrategia de RNAi para reducir sus niveles de mRNA en raíces de poroto seguida de una caracterización del fenotipo. El silenciamiento de *PvCYCP4-1* produjo a una marcada reducción en la cantidad y el tamaño de los nódulos formados por *Rhizobium etli* y afectó negativamente la

frecuencia de los eventos de infección. Estos datos sugirieron que *PvCYCP4-1* podría desempeñar un papel en la activación de las divisiones de células corticales necesarias para el desarrollo de nódulos y la infección de rizobios.

Por otro lado, para investigar el papel de las moléculas de señalización bacterianas en la activación de los genes de respuesta a la simbiosis, hemos realizado un análisis del transcriptoma de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con cepas mutantes de *R. etli* defectuosas en la síntesis de Nod Factor, exopolisacáridos o lipopolisacáridos. Se identificó un gen asociado a la regulación de la expresión génica mediada por pequeños RNAs, que codifica una proteína con dominio XH/XS. Este gen es ortólogo al gen *IDN2* de *Arabidopsis thaliana*, una proteína de unión a RNA de doble cadena involucrada en la ruta de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM). Para obtener información sobre el papel de *PvIDN2* durante la infección de la raíz y la organogénesis de los nódulos, se llevó cabo un análisis funcional de *PvIDN2* utilizando RNAi. El análisis fenotípico mostró que las plantas con niveles reducidos de *PvIDN2* exhibieron una reducción en el número de nódulos formados por *R. etli* en comparación con las raíces de control. Además, la frecuencia de los eventos de infección se vio afectada por el silenciamiento de *PvIDN2*. Estos resultados sugieren que *PvIDN2* podría desempeñar un papel tanto en la infección de rizobios como en la organogénesis de los nódulos en las raíces de *P. vulgaris*. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación de DNA metilado (MeDIP) pudimos demostrar que el silenciamiento génico postranscripcional de *PvIDN2* afecta los niveles de metilación de genes que se encuentran asociados a los picos de acumulación de hetsiRNAs, permitiendo establecer una relación entre *PvIDN2* y la ruta del RdDM.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen a comprender en mayor detalle los mecanismos moleculares que gobiernan el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno eficiente entre *P. vulgaris* y *R. etli*, además de que sienta las bases para futuros proyectos de investigación que permitan optimizar la fijación de nitrógeno en una planta de alto valor social e interés agronómico.

# ABREVIATURAS

*Ab*: *antibody*

AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphism

AGO4: argonauta 4

AP2: APETALA 2

ATP: adenosina tri-fosfato

CCaMK: calcium and calmodulin-binding kinase

cDNA: DNA complementario

ChIP: chromatin immunoprecipitation

Chl: *chloroform*

CLSY1: Classy 1

CMT3: cromometilasa 3

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

CYC: ciclina

DCL3: Dicer like 3

DMI: doesn't make infections

DMS3: defective in meristem silencing 3

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

DPI: días post-inoculación

DRM: domain rearranged methyltransferase

dsRNA: RNA de doble cadena

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

eEF1 $\alpha$ : eukaryotic elongation factor 1  $\alpha$

ENODs: Early Nodulin

EPS: exopolisacárido

ERN1: ERF Required for Nodulation 1

FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno

FLAG: péptido DYKDDDDK

FPKM: Fragments Per Kilobase per Million

gDNA: DNA genómico

GFP: Green Fluorescence Protein

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

GUS:  $\beta$ -glucuronidasa

HEN1: hua enhancer 1

het-siRNAs: siRNAs heterocromáticos

hpi: horas post-inoculación

h: hora

IDN2: involved in de novo 2

IDP: *IDN2* paralog

Ig: Inmunoglobulina

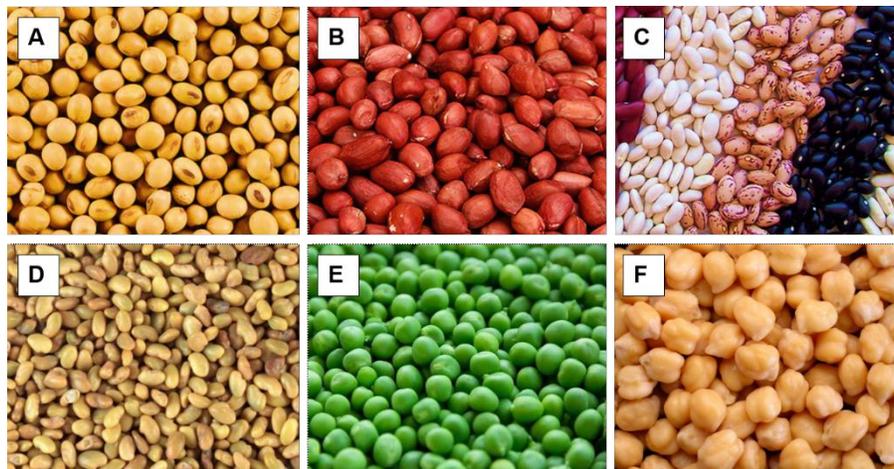
IP: input sample  
IsoA: isoamyl alcohol  
IT: infection thread  
Kb: kilobase  
KTF1: kow domain-containing transcription factor 1  
LB: medio de cultivo *Luria-Bertani*  
lncRNAs: RNAs no codificantes largos  
LPS: lipopolisacárido  
LRR: leucine rich repeat  
LysM: lysin motif  
MeDIP: Methylated DNA Immunoprecipitation  
MET1: metiltransferasa 1  
min: minuto  
miRNA: micro RNA  
mRNA: RNAs mensajero  
Mt: Millones de toneladas  
NF: nod factor  
NFR: Nod factor receptor  
NF-Y: Nuclear factor Y  
NIN: nodule inception  
NSP: Nodulation Signaling Pathway  
nt: nucleótido  
Pb: pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
Ph: fenol  
Pol: Polimerasa  
PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing  
RdDM: metilación del DNA dirigido por RNA  
RDM1: required for DNA methylation 1  
RDR2: RNA polimerasa dependiente de RNA  
RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA  
RNA: ácido ribonucleico  
RNAi: RNA de interferencia  
RPKM: Reads Per Kilobase per Million  
rpm: revoluciones por minuto  
RT: transcripción reversa  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
SEM: standard error of de mean  
SHH1: sawadee homeodomain homologue 1  
SIN1: Scarecrow like-13 involved in nodulation  
sRNA: small RNA  
SYMRK: Symbiosis Receptor Kinase  
TBE: TRIS buffer EDTA  
T-DNA: DNA de transferencia de *Agrobacterium*

TE: elementos transponibles  
TF: factor de transcripción  
UTR: región no traducida  
UV: luz ultravioleta  
YEM: Yeast Extract Mannitol

# INTRODUCCIÓN

## 1. Las leguminosas y la fijación biológica de nitrógeno

Las leguminosas (*Fabaceae* o *Leguminosae*), constituyen la tercera familia más grande de plantas con flores (Doyle et al., 2003), con aproximadamente 20.000 especies (Gepts et al., 2005). Parte de su éxito se debe a que la mayoría de las *Fabaceae* son capaces de establecer una simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, caracterizada por la formación de un órgano especializado llamado nódulo. Entre las especies de leguminosas más importantes desde el punto de vista agronómico se encuentran la soja (*Glycine max*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*), la arveja (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), la alfalfa (*Medicago sativa*) y el maní (*Arachis hypogaea*) (Figura 1). Estas plantas son utilizadas directamente para la alimentación humana o bien como forraje en la actividad ganadera. Como alimento, las leguminosas de grano se caracterizan por poseer un alto contenido proteico, son fuentes importantes de hidratos de carbono, de calcio, hierro y fósforo (Graham et al., 2003).



**Figura 1. Leguminosas de importancia agronómica.** A. Soja (*Glycine max*) (A), maní (*Arachis hypogaea*) (B), poroto (*Phaseolus vulgaris*) (C), alfalfa (*Medicago sativa*) (D), arveja (*Pisum sativum*) (E), y garbanzo (*Cicer arietinum*) (F).

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que forma parte de moléculas esenciales para la vida, tales como proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas. A pesar de que el N<sub>2</sub> constituye el 78% de la atmósfera, sólo un número limitado de organismos son capaces de asimilarlo de manera directa a partir de esta forma. Para obtener el nitrógeno necesario en suelos con limitaciones de este nutriente, varios géneros de plantas establecen relaciones simbióticas beneficiosas con microorganismos del suelo. Los únicos seres vivos capaces de reducir el N<sub>2</sub> a formas asimilables (amonio, nitrato, nitrito), para sí mismos y para otros organismos, son un grupo especializado de organismos procariotas. El proceso mediante el cual reducen el N<sub>2</sub>, denominado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), consiste en una reacción metabólica que combina el nitrógeno atmosférico con hidrógeno para formar amoníaco. La reacción es llevada a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa, presente exclusivamente en estos microorganismos, mediante la siguiente reacción:



Los microorganismos fijadores de nitrógeno se distribuyen en muy variados grupos taxonómicos y reducen el N<sub>2</sub> en diferentes situaciones, esto es, en estado libre en el suelo o asociados a las plantas en una relación simbiótica fijadora de N<sub>2</sub>. Dicha simbiosis se divide en dos grupos: la simbiosis entre plantas y cianobacterias, la cual está más ampliamente distribuida, y la simbiosis llevada a cabo en los nódulos de las raíces, que se encuentra restringida a las familias *Fabaceae*, *Fagales*, *Cucurbitales* y *Rosales*. Las *Fagales*, *Cucurbitales* y *Rosales* (excepto *Parasponia*) se asocian con bacterias gram-positivas (del género *Frankia*), mientras que, las leguminosas (*Fabaceae*) y *Parasponia* pueden

interactuar con bacterias gram-negativas del suelo llamadas rizobios (Delaux et al., 2015).

La presencia de señales químicas provenientes de los rizobios induce la formación de un nuevo órgano en la raíz de la planta llamado nódulo, dentro del cual la bacteria reduce el  $N_2$  atmosférico en compuestos asimilables para la planta (Oldroyd, 2013).

El desarrollo del proceso Haber y Bosch para la obtención de amonio fue uno de los avances más importantes del siglo XX, ya que permitió el uso masivo de fertilizantes nitrogenados sintéticos, con un fuerte impacto positivo sobre la productividad agrícola. Se estima que se fijan 120 Mt (millones de toneladas) de nitrógeno al año mediante el proceso de Haber y Bosch, mientras que la fijación de nitrógeno por fuentes naturales es de sólo 63 Mt anuales (Fowler et al., 2013). Sin embargo, la utilización indiscriminada de fertilizantes trae aparejados graves problemas económicos y ambientales. Solamente una pequeña fracción del amonio de los fertilizantes es incorporado por las plantas, mientras que el resto es convertido en distintos compuestos nitrogenados. Una porción del nitrógeno retorna a la atmósfera en forma de óxido nitroso ( $N_2O$ ), un potente gas de efecto invernadero (Sutton et al., 2011). Otra parte del nitrógeno es convertido en distintos óxidos de nitrógeno que generan lluvia ácida, afectando la productividad de los suelos (Galloway et al., 2008). La FBN por el contrario, representa una alternativa natural y de bajo costo de implementación que puede contribuir a mitigar esta problemática de una forma sustentable (Duhamel et al., 2013). La interacción entre leguminosas y rizobios se ve favorecida en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, lo que permite a las leguminosas propagarse en suelos pobres en nutrientes, beneficiando a la agricultura, reduciendo la contaminación y el daño ambiental causado por la fertilización química

(Graham et al., 2014). Las leguminosas se utilizan en la rotación de cultivos, promoviendo la diversidad, reduciendo significativamente las poblaciones de patógenos vegetales y proveyendo una fertilización natural a los suelos para los subsecuentes cultivos (Lawlor et al., 2001). Además de las cuestiones ambientales y económicas mencionadas, el cultivo de leguminosas posee gran importancia económica y social para las economías regionales, como el noroeste argentino. Todas estas razones justifican la necesidad de profundizar el estudio y mejoramiento del proceso de fijación de nitrógeno a través de la optimización de la asociación de leguminosas con rizobios con el fin de aumentar el rendimiento de los cultivos en forma sustentable.

## **2. *Phaseolus vulgaris***

El poroto es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano en el mundo. Debido a su alto contenido en proteínas, las semillas de poroto son utilizadas como complemento de dietas ricas en hidratos de carbono, siendo los principales consumidores África y América latina. Además, constituye una fuente rica de vitaminas y minerales, tales como biotina, hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc y cobre (Broughton et al., 2003).

Actualmente, en Argentina se producen aproximadamente 300.000 toneladas de cultivo de poroto al año (Cámara de Legumbres de la República Argentina, CLERA, [www.clera.com.ar](http://www.clera.com.ar)). Se exporta un 95% del total producido, posicionando a Argentina entre los primeros diez países productores y exportadores a nivel mundial. La producción de poroto se lleva a cabo fundamentalmente en la región del Noroeste Argentino (NOA),

que cuenta con las condiciones agroclimáticas aptas para su desarrollo. La provincia de Salta es la principal productora, pero también se produce en menores volúmenes en Santiago del Estero, Jujuy, Tucumán y Catamarca (Vizgarra et al., 2016). Las exportaciones argentinas tienen distintos mercados según la variedad de poroto. Por un lado el poroto negro, dirigido principalmente a países latinoamericanos y africanos y por otra parte el mercado de poroto alubia, de alta calidad y valor, destinado a países europeos del Mediterráneo.

### **3. Simbiosis fijadora de Nitrógeno**

#### **3.1. Asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios**

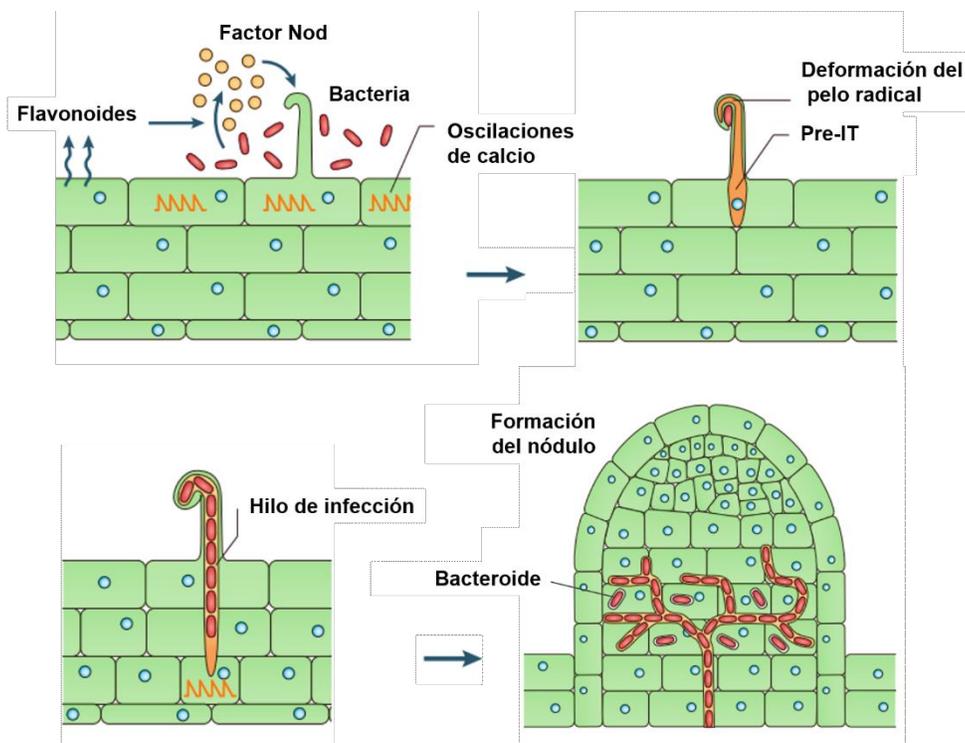
La interacción entre leguminosas y rizobios se inicia generalmente en suelos con baja disponibilidad de nitrógeno. Cuando la planta sensa esta limitación, las raíces secretan compuestos fenólicos (flavonoides e isoflavonoides) a la rizósfera que son reconocidos por la bacteria, activando el factor de transcripción NodD (Perret et al., 2000). Este regulador transcripcional reconoce y se une a los promotores bacterianos de los genes *nod*, que participan en la síntesis de una molécula lipoquitooligosacárida conocida como factor de nodulación (NF, por *Nod Factor*) (Perret et al., 2000; Geremia et al., 1994). El esqueleto carbonado de esta molécula puede presentar diversas modificaciones químicas entre los NF producidos por diferentes especies de rizobios y son responsables primariamente de la compatibilidad de la interacción entre la planta leguminosa hospedadora y especies particulares de rizobio (Oldroyd y Downie, 2008). Los NF son suficientes para activar la organogénesis del nódulo y pueden inducir cambios celulares asociados a la iniciación de

la infección rizobiana (Oldroyd y Downie, 2008). Además, otras moléculas secretadas por el rizobio o expuestas en la pared celular, como exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS), participan en el intercambio de señales que resulta en el establecimiento de la simbiosis (Eisenschenk et al., 1994; Downie, 2010).

### **3.2. Proceso de infección y organogénesis del nódulo**

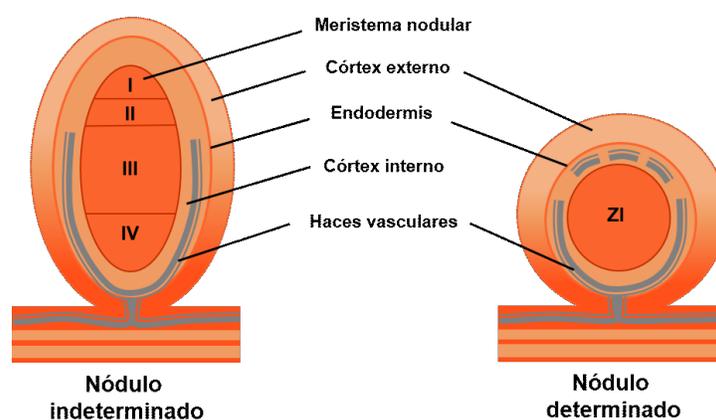
La formación de un nódulo funcional depende de la ejecución coordinada de dos programas genéticos, la infección, que ocurre a través de la epidermis, y la organogénesis del nódulo, que se inicia por la reactivación del ciclo celular de las células internas de la raíz (Figura 2). En la mayoría de las leguminosas, el paso inicial en la simbiosis es la adhesión de la bacteria a la epidermis de la raíz, principalmente a las células del pelo radical. La bacteria adherida sintetiza NF, el cual genera un cambio en la dirección del crecimiento polar del pelo radical, por lo que se forma una estructura de rulo que rodea a la microcolonia de bacterias, formando el bolsillo de infección (*infection pocket*). Luego, se produce la degradación de la pared celular vegetal, la invaginación de la membrana plasmática y la formación de una estructura tubular llamada hilo de infección (IT, por *infection thread*). La bacteria penetra y se multiplica dentro del IT, el cual avanza a través de la epidermis hacia el córtex y se ramifica hasta llegar al primordio del nódulo. Simultáneamente con el proceso de infección, se activa la mitosis del ciclo celular de las células corticales en respuesta al NF, llevando a la formación del meristema del primordio de nódulo (Oldroyd y Downie, 2008). En este contexto, los factores de transcripción NF-YA1 y NF-YC1, juegan un rol en la regulación de genes involucrados en el control de la transición G2/M del ciclo celular, tales como *CDC2* y *CDC25* (Zanetti et al., 2010). Cuando

el IT alcanza las células del primordio, las bacterias son liberadas dentro de las células corticales rodeadas de una membrana derivada de la célula vegetal, formándose unas estructuras subcelulares denominadas simbiosomas. Dentro de los simbiosomas, las bacterias finalmente se diferencian a bacteroides y llevan a cabo la reacción de fijación del nitrógeno atmosférico, catalizada por el complejo multienzimático de la nitrogenasa (Van Brussel et al., 1992) (Figura 2).



**Figura 2. Infección rizobiana y organogénesis del nódulo.** La interacción se inicia cuando la raíz exuda flavonoides y son reconocidos por los rizobios, que en respuesta sintetizan y secretan NF. La percepción de NF por receptores de la raíz activa la vía de señalización de la simbiosis, lo que conduce a oscilaciones de calcio, inicialmente en las células epidérmicas, generando la deformación del pelo y la formación del IT. A su vez, se inicia la división de las células corticales para formar el primordio nodular. El rizobio se divide monoclonalmente dentro del IT, que crece hacia el interior el primordio. Cuando se alcanzan las células corticales en división, las bacterias son internalizadas y rodeadas por una membrana de origen vegetal formando estructuras llamadas simbiosomas. Dentro de estos simbiosomas la bacteria se diferencia a bacteroide y lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Adaptado de Oldroyd et al., 2013).

Los nódulos pueden ser clasificados dentro de dos grupos principales según su modo de desarrollo (Franssen et al., 1992; Maunoury et al., 2008). Las leguminosas de climas templados, como *M. truncatula* y *P. sativum*, desarrollan nódulos de tipo indeterminado; mientras que las leguminosas de climas tropicales y subtropicales, como *P. vulgaris*, *G. max* y *Lotus japonicus*, forman nódulos de tipo determinado (Figura 3). Los nódulos indeterminados se caracterizan por la presencia de un meristema persistente en la zona apical responsable de su crecimiento, generando un órgano de forma cilíndrica. El meristema se desarrolla a partir de la tercera capa celular del córtex, mientras que algunas capas de la base del nódulo se originan de la división de células del córtex interno, periciclo y endodermis (Xiao et al., 2014). Por otro lado, los nódulos determinados se desarrollan a partir de divisiones celulares del córtex externo, su actividad meristemática desaparece tempranamente y dan lugar a nódulos de forma esférica que crecen por expansión celular (Ferguson et al., 2010; Xiao et al., 2014).



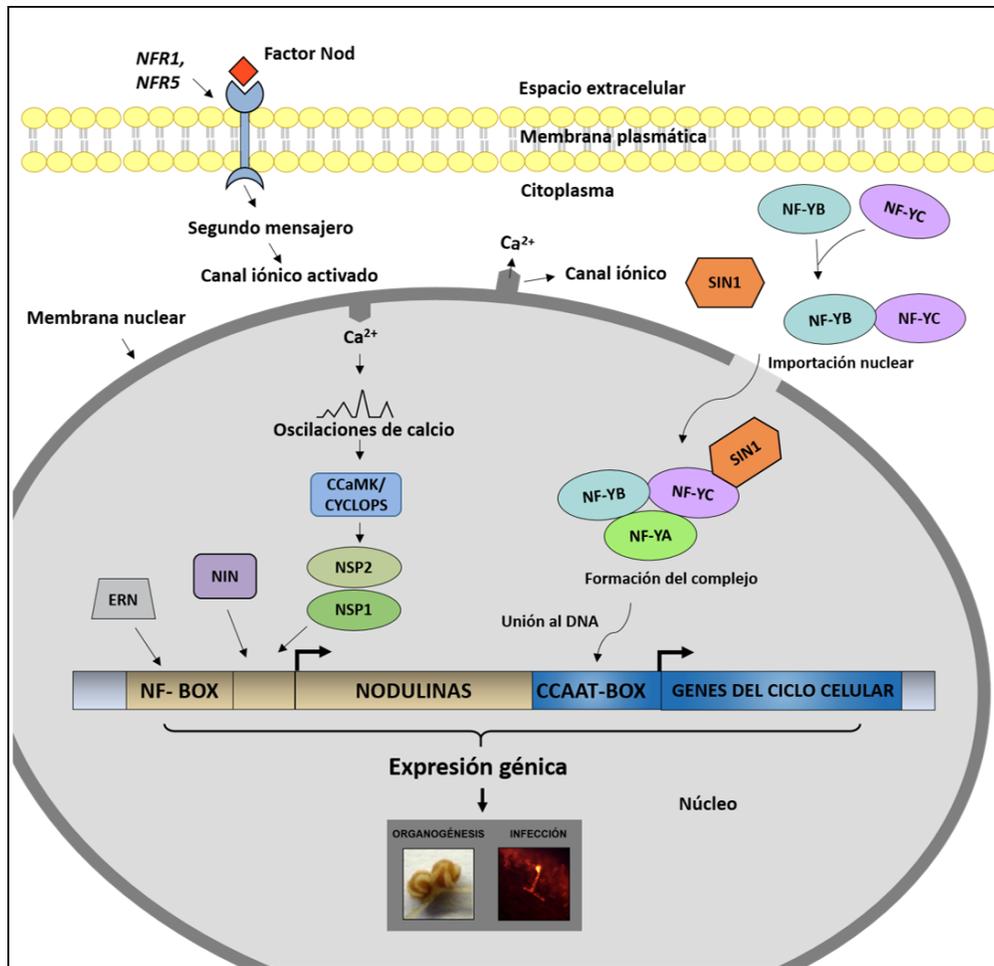
**Figura 3. Morfología general de un nódulo indeterminado y de un nódulo determinado.** En el nódulo indeterminado se diferencian 4 zonas: la zona meristemática (I), la zona de infección (II), la zona de fijación biológica del nitrógeno (III) y la zona de senescencia (IV). En el nódulo determinado solo se forma la zona de infección (ZI), donde ocurre la fijación del nitrógeno.

### 3.3. Vía de señalización de la nodulación

Los cambios morfológicos que ocurren en las células epidérmicas de la raíz son acompañados por una serie de respuestas a nivel molecular. El NF es percibido por dos receptores tipo Serina/Treonina quinasa con dominios extracelulares LysM (*lysin motif*), denominados NFR1 (*Nod factor receptor 1*) y NFR5 (*Nod factor receptor 5*) en *L. japonicus* (Radutoiu et al., 2003; Madsen et al., 2003). Los dominios extracelulares LysM reconocen y unen NFs (Mulder et al., 2006), desencadenando oscilaciones en la concentración de calcio (*calcium spiking*), tanto dentro como alrededor del núcleo de las células epidérmicas (Ehrhardt et al., 1996; Shaw y Long, 2003). La cascada de señalización inducida por NF también requiere de un receptor tipo quinasa con un dominio extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) conocido como SYMRK (*symbiosis receptor like kinase*) en *L. japonicus* o DMI2 (*does not make infection 2*) en *M. truncatula* (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Mutantes de *DMI2/SYMRK* son incapaces de formar nódulos e ITs, mientras que la sobreexpresión de los mismos resulta en la formación espontánea de nódulos (Ried et al., 2014; Saha et al., 2014). El ligando del dominio extracelular LRR de SYMRK/DMI2 aún no ha sido identificado, sin embargo, se ha reportado que la región extracelular de DMI2 contiene dos dominios MLDs (*Malectin-Like Domain*), los cuales son indispensables para la acumulación del receptor DMI2 en respuesta al rizobio y que dicha acumulación es independiente del NF (Pan et al., 2018). El dominio MLD reconoce y une polisacáridos de tipo glucano (Schallus et al., 2008), lo que sugiere que DMI2 podría reconocer moléculas secretadas por la bacteria. El dominio quinasa intracelular de SYMRK/DMI2 se asocia con la proteína 3-hidroxi-metilglutaril-CoA

reductasa, una enzima involucrada en la producción de mevalonato (Kevei et al., 2007). Este metabolito podría actuar como un segundo mensajero que transmitiría la percepción de la bacteria hacia el núcleo. Otros componentes requeridos para la generación de las oscilaciones de calcio son las nucleoporinas NUP133, NUP85 y NENA (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007); los canales de potasio denominados CASTOR y POLLUX/DMI1 (Charpentier et al., 2008; Ané et al., 2004); así como también las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) (Charron y Sibley, 2004); y una bomba de calcio impulsada por ATP (Engstrom et al., 2002). Recientemente se han identificado tres canales activados por nucleótidos cíclicos, denominados CNGC15 *a*, *b* y *c* (*cyclic nucleotide-gated channel*), como los responsables de la liberación de calcio hacia el nucleoplasma, los cuales se localizan en la envoltura nuclear e interaccionan con el canal de potasio DMI1 (Charpentier et al., 2016). Las oscilaciones de calcio generadas serían percibidas por una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, denominada CCaMK (*calcium and calmodulin-binding kinase*) en *L. japonicus* (Levy et al., 2004) y DMI3 en *M. truncatula* (Mitra et al., 2004). La activación de esta proteína es suficiente para inducir el proceso de simbiosis, ya que mutaciones de ganancia de función en CCaMK inducen la nodulación en ausencia de rizobio (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006). CCaMK se asocia y fosforila a CYCLOPS (IPD3 en *M. truncatula*), iniciando la activación de una cascada de regulación transcripcional durante el proceso de asociación simbiótica (Yano et al., 2008; Horváth et al., 2011; Messinese et al., 2007). El complejo CCaMK/CYCLOPS fosforilado se une al promotor del gen que codifica para el factor de transcripción NIN (*Nodule inception*), activando su transcripción (Singh et al., 2014). El factor NIN es requerido tanto para la infección bacteriana como para el inicio de

las divisiones celulares en el córtex que van a dar lugar al nódulo (Schauser et al., 1999). También se identificaron dos factores de transcripción de la familia GRAS (*Gibberellic Acid-Insensitive (GAI)*, *Repressor of GAI*, y *Scarecrow*) que son requeridos para la regulación de *NIN*, llamados NSP1 y NSP2 (*Nodulation Signaling Pathway 1 y 2*, respectivamente). Estos factores, que son esenciales para la nodulación, median respuestas tales como la deformación del pelo radical, la formación del hilo de infección, el inicio de las divisiones corticales y la expresión de genes asociados a la nodulación, llamados nodulinas (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Heckmann et al., 2006). NSP1 y NSP2 forman un heterodímero que se une a las regiones promotoras de *ENOD11 (Early nodulin 11)*, un gen de nodulación temprano y a los genes que codifican los factores de transcripción *NIN* y *ERN1 (Ethylene Response Factor Required for Nodulation 1)* (Boisson-Dernier et al., 2001; Journet et al., 2001; Hirsch et al., 2009). A su vez, *NIN* controla directamente la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción de tipo NF-Y (*Nuclear factor Y*), *NF-YA1* y *NF-YB1* (Soyano et al., 2013), los cuales promueven la reactivación del ciclo celular, reiniciando las divisiones mitóticas de las células del córtex requeridas para la organogénesis del nódulo (Combiér et al., 2006; Zanetti et al., 2010; Laloum et al., 2013; Baudin et al., 2015) (Figura 4).



**Figura 4. Factores de transcripción involucrados en la vía de señalización de la simbiosis entre leguminosas y rizobios.** La vía de señalización de la nodulación es activada cuando los receptores de tipo LysM-RLK (*LysM domain receptor-like kinase*) NFR1 y NFR5, localizados en la membrana plasmática, sensan los NF y transmiten la señal al citoplasma, desencadenando oscilaciones de calcio (*calcium spiking*) alrededor del núcleo. Las oscilaciones de calcio serían decodificadas por una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK), que fosforila al factor de transcripción CYCLOPS, iniciando una activación jerárquica de factores de transcripción que involucra a NSP1, NSP2, NIN y ERN y finaliza con la reprogramación celular requerida para la nodulación. Miembros de la familia de genes NF-Y también son requeridos para la nodulación. NF-YB interactúa primero con la subunidad NF-YC en el citoplasma y luego el heterodímero es importado al núcleo. Una vez en el interior del núcleo, estos factores interactuarían con NF-YA para formar un heterotrímero funcional uniéndose con alta afinidad a elementos CCAAT. SIN1, un miembro de la familia GRAS, interactúa físicamente con la subunidad C del factor de transcripción NF-Y en el núcleo. Este complejo multimérico está involucrado, directa o indirectamente, en la activación de genes del ciclo celular que promueven las divisiones celulares en el córtex del nódulo. Figura adaptada de Rípodas et al., 2014.

#### **4. Funciones de los factores de transcripción NF-Y y SIN1 en la nodulación**

Como se mencionó en la sección anterior, los factores de transcripción NF-Y juegan un rol importante como reguladores de la expresión génica durante la nodulación. Están formados por un heterotrímero compuesto por las subunidades NF-YA, NF-YB y NF-YC, que reconoce y se une con alta afinidad a las cajas CCAAT, elementos *cis* presentes en el 30% de los promotores eucarióticos, activando o reprimiendo la transcripción de genes presentes río abajo de estas secuencias (Ceribelli et al., 2008; Mantovani, 1999). La subunidad NF-YA está implicada en el reconocimiento y la unión de la caja CCAAT, pero sólo puede llevar a cabo dicha unión en presencia de las subunidades NF-YB y NF-YC. Las proteínas NF-YA se caracterizan por poseer dos dominios altamente conservados: el dominio A1 forma una alfa hélice involucrada en la interacción con las subunidades NF-YB y NF-YC, y el dominio A2 es requerido para la unión a la caja CCAAT (Mantovani, 1999). Las subunidades NF-YB y NF-YC, en cambio, contienen dominios tipo histonas, que permiten su dimerización antes de asociarse con NF-YA (Romier et al., 2003).

En levaduras y metazoos, cada subunidad NF-Y está codificada por uno o dos genes, mientras que en plantas cada unidad se encuentra codificada por una familia génica compuesta por entre 10 y 39 miembros según la especie. Se ha demostrado que subunidades individuales de NF-Y están involucradas en múltiples procesos de desarrollo y/o respuestas a señales ambientales, tales como la embriogénesis (Lotan et al., 1998; Kwong et al., 2003), producción de semillas (Kumimoto et al., 2013; Siriwardana et al., 2014), floración dependiente del fotoperiodo (Ben-Naim et al., 2006; Kumimoto et al., 2010), desarrollo del tubo polínico y elongación de la raíz (Ballif et al., 2011). También

participan en la respuesta a estrés por sequía y en la respuesta del retículo endoplásmico (Laloum et al., 2013; Combier et al., 2008).

En leguminosas, miembros de las familias de genes NF-Y han sido implicados en el desarrollo de nódulos determinados (*MtNF-YA1* en *M. truncatula*) e indeterminados (*LjNF-YA1* en *L. japonicus* y *PvNF-YC1* y *PvNF-YA1* en *P. vulgaris*). *MtNF-YA1* es un factor de transcripción que juega un papel central durante etapas tempranas de la interacción simbiótica e infección rizobiana, siendo requerido además durante la organogénesis del nódulo a través del control de la persistencia del meristema (Combier et al., 2006; Combier et al., 2008; Laporte et al., 2014). La expresión de *MtNF-YA1* está restringida a la zona meristemática por un mecanismo de regulación postranscripcional mediado por el microRNA169a. Además, se ha demostrado que la expresión del gen *MtNF-YA1* es alta durante estadios tempranos de la interacción simbiótica, específicamente en los pelos radicales de la zona de infección (Laporte et al., 2014). Cuando se silencian de manera simultánea *MtNF-YA1* y su parálogo *MtNF-YA2*, se ha observado un fenotipo más marcado, mostrando que ambas subunidades presentan redundancia génica parcial (Laloum et al., 2014). Por otro lado, en *L. japonicus*, el silenciamiento de *LjNF-YA1* inhibe la organogénesis del nódulo, sin afectar el proceso de infección (Soyano et al., 2013). La subunidad NF-YB también ha sido implicada en las interacciones leguminosa- rizobio. En Lotus, *LjNF-YB1* fue identificado como un blanco directo de NIN y cuando se co-expresó con *LjNF-YA1* aumentó el efecto sobre las divisiones celulares y la organogénesis de la raíz lateral (Soyano et al., 2013). Consistentemente, mediante ensayos de doble híbrido de levadura se identificó que *MtNF-YB16*, el ortólogo de *LjNF-YB1* en *M. truncatula*, forma un

trímero con las subunidades MtNF-YA1/2 y MtNF-YC1/2, y a su vez, en *P. vulgaris*, se forma el trímero NF-Y entre las subunidades PvNF-YB7, PvNF-YC1 y PvNF-YA1 (Baudin et al., 2015). Estos resultados sugieren que estas tres subunidades que conforman el trímero juegan un rol evolutivamente conservado en leguminosas durante el desarrollo del nódulo.

Estudios de genética reversa llevados a cabo en *P. vulgaris* han demostrado que la subunidad NF-YC1 es requerida para la infección y la organogénesis del nódulo, posiblemente mediante la regulación directa o indirecta de la expresión de genes del ciclo celular de transición G2/M durante las etapas iniciales de la interacción simbiótica. Por otro lado, se demostró, que NF-YC1 juega un papel clave en la selección de cepas de rizobios que son más eficientes en la interacción entre *R. etli* y *P. vulgaris* (Zanetti et al., 2010). Ensayos de competencia mostraron que las plantas que sobreexpresan *PvNF-YC1* tienen un mayor porcentaje de ocupación por la cepa menos eficiente y competitiva. Esto significa que la sobreexpresión de *PvNF-YC1* es suficiente para reducir notablemente la selectividad de la planta frente a las distintas cepas de rizobio, permitiendo que las menos competitivas logren ocupar el nódulo (Zanetti et al., 2010).

Con el fin de identificar *targets* directos del factor de transcripción PvNFY-C1, se llevaron a cabo en nuestro laboratorio experimentos de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de PCR (ChIP-PCR). Para ello, se utilizaron *primers* flanqueando los elementos CCAAT presentes en las regiones promotoras de *ERN1* y *ERN2*, dos factores de transcripción que son regulados directamente por MtNF-YA1, MtNF-YC2 y MtNF-YB16 en *M. truncatula* (Laloum et al., 2014; Baudin et al., 2015) y de genes del ciclo celular, tales como *CDC25*,

*CDC2*, *WEE*, *CYCP* y *CYCC*. Los resultados de CHIP-PCR mostraron que las regiones promotoras de los genes *ERN1* y *PvCYCP4-1* se encontraban enriquecidas en los inmunoprecipitados de raíces que expresan HF-NF-YC1 comparado con las raíces controles transformadas con el vector vacío, sugiriendo que el factor PvNF-YC1 se une directamente a la región promotora de estos dos genes y modula su expresión (Clúa, Tesis de doctorado, 2018.). Este resultado indicaría una relación entre los factores NF-Y y la regulación del ciclo celular mediante la activación transcripcional de una ciclina de tipo P, que podría estar involucrada en el reinicio de las divisiones corticales que dan origen al nódulo.

Mediante un *screening* de una biblioteca de doble híbrido de levadura realizado en nuestro laboratorio, se logró identificar un factor de tipo GRAS denominado SIN1 (*Scarecrow-like13 Involved in Nodulation*). Los factores de transcripción GRAS son parte de una gran familia de proteínas específicas de plantas con al menos 33 y 60 miembros en *A. thaliana* y *Oryza sativa*, respectivamente (Pysh et al., 1999; Tian et al., 2004; Lee et al., 2008). Los miembros de esta familia poseen diversas funciones en el desarrollo del tallo y la raíz, y en las vías de transducción de señales controladas por los fitocromos A y B (Bolle, 2004). SIN1 se localiza entre el citoplasma y el núcleo (Zanetti et al., 2010) y es capaz de interactuar físicamente con NF-YC1 en el núcleo (Battaglia et al., 2014). El silenciamiento de *SIN1* mediado por RNAi provocó una reducción tanto del número de los nódulos formados como de su tamaño. Por otra parte, la reducción de los niveles de *SIN1* no afectó el número de ITs, pero sí la progresión de los mismos hacia las células del córtex. SIN1 es requerido además para la activación de la expresión de genes del ciclo celular

durante la formación del nódulo, como en el caso de PvNF-YC1 (Battaglia et al., 2014; Rípodas et al., 2014).

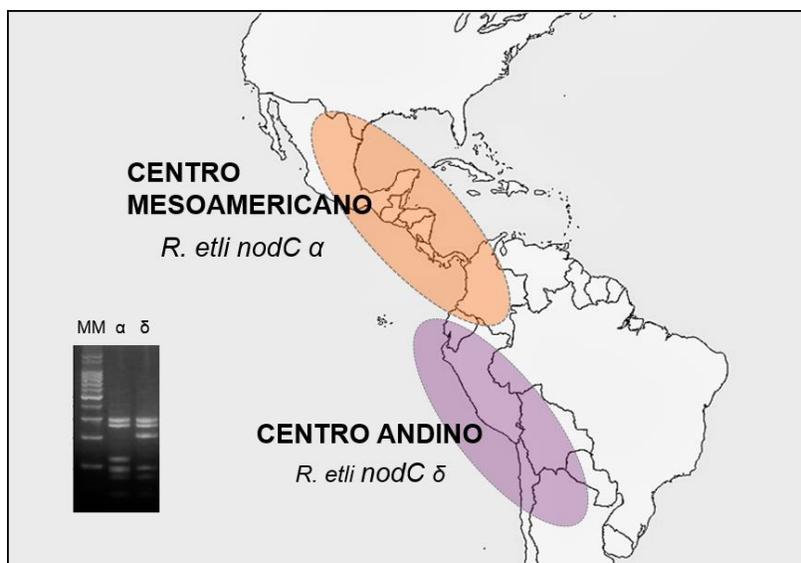
## **5. Asociación simbiótica preferencial entre *P. vulgaris* y *R. etli***

A lo largo de muchos años se debatió intensamente el origen geográfico exacto de *P. vulgaris*. Inicialmente se consideró la región de Ecuador y Perú como su centro de origen (Kami et al., 1995). Sin embargo, estudios recientes basados en polimorfismos de nucleótidos, polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y análisis genómicos proponen que *P. vulgaris* se originó en la región Mesoamericana y luego se expandió hacia la región de América del Sur hace aproximadamente 165.000 años, dando lugar a la formación de dos grandes *pooles* génicos silvestres geográficamente y genéticamente aislados (Bitocchi et al., 2012, 2017; Schmutz et al., 2014; Rendón-Anaya et al., 2017; Rossi et al., 2009). Luego de la formación de estos *pooles* génicos, tuvo lugar una domesticación paralela e independiente hace unos 8000 años, que dio origen a las variedades Mesoamericanas (actual territorio de México, América Central y Colombia) y las variedades Andinas en América del Sur (Ecuador, Bolivia, Perú, y Argentina) (Bitocchi et al., 2012, 2013; Gepts et al., 1986; Mamidi et al., 2011). La domesticación de plantas a menudo se asocia con una serie de cambios morfológicos. En el caso del poroto común, la domesticación ha llevado a un aumento en el tamaño de la semilla y las hojas, así como a cambios en hábitos de crecimiento y otras características (Bitocchi et al., 2013).

*P. vulgaris* es capaz de formar nódulos con una gran diversidad de genotipos de rizobios. Hasta la fecha, cinco especies de *Rhizobium* han sido reconocidos como simbiosomas de *P.*

*vulgaris*: *R. etli* bv. Phaseoli, *R. leguminosarum* bv. Phaseoli, *R. tropici*, *R. gallicum*, y *R. giardini*. Entre los rizobios capaces de establecer simbiosis con *P. vulgaris*, *R. etli* es la especie predominante, encontrándose asociada tanto a variedades de poroto silvestres, como a cultivares agronómicos de México, Colombia y la región sur Andina (Amarger, 2001). La abundancia de las cepas de *R. etli* presentes en cada centro de diversificación genética fue correlacionada con el análisis de polimorfismo del gen *nodC* de *R. etli*, el cual codifica una *N*-acetylglucosamina transferasa involucrada en la síntesis del NF. Las cepas que portan el alelo *nodC* tipo  $\alpha$  (cepas tipo  $-\alpha$  de acá en adelante) predominan en suelos Mesoamericanos, mientras que las que llevan el alelo *nodC* tipo  $\delta$  (cepas tipo  $-\delta$ ) están altamente representadas en suelos Andinos (Aguilar et al., 2004) (Figura 5). Asimismo, los cultivares de la región Mesoamericana son nodulados preferentemente y forman un mayor número de nódulos con cepas *nodC*- $\alpha$  respecto de aquellas que poseen la forma *nodC*- $\delta$ , mientras que en las variedades Andinas ocurre el fenómeno inverso (Meschini et al., 2008). Interesantemente, ensayos de coinoculación con ambas cepas de rizobio demostraron que los nódulos de la variedad Mesoamericana estaban ocupados preferentemente por cepas *nodC*- $\alpha$  (Aguilar et al., 2004; Meschini et al., 2008). Estos datos sugieren que ciertas variedades de *P. vulgaris* son capaces de discriminar y ser noduladas preferencialmente por cepas de *R. etli* con las que habrían coevolucionado en el centro geográfico de diversificación y domesticación (Aguilar et al., 2004). Estudios previos en nuestro laboratorio utilizando una estrategia de hibridación sustractiva permitieron identificar 41 genes que se expresan de forma diferencial y específica en un cultivar de poroto mesoamericano en respuesta a la cepa *R. etli* SC15 (portador del alelo *nodC*- $\alpha$ ) a

tiempos tempranos de la interacción simbiótica (Meschini et al., 2008). Uno de estos genes codifica a PvNF-YC1, cuyos transcritos aumentan su expresión específicamente en respuesta a las cepas de tipo *nodC*- $\alpha$  (Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010). Los resultados obtenidos del análisis funcional por RNAi y sobreexpresión de *PvNF-YC1* sustentan la idea que dicho gen participaría en la regulación de la expresión génica que lleva a una nodulación más eficiente. La expresión ectópica de *PvNF-YC1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* iguala la capacidad competitiva de ambas cepas en experimentos de coinoculación, sugiriendo que *PvNF-YC1* formaría parte de los mecanismos moleculares que determinan la preferencia de cepa en la formación de nódulos (Zanetti et al., 2010).

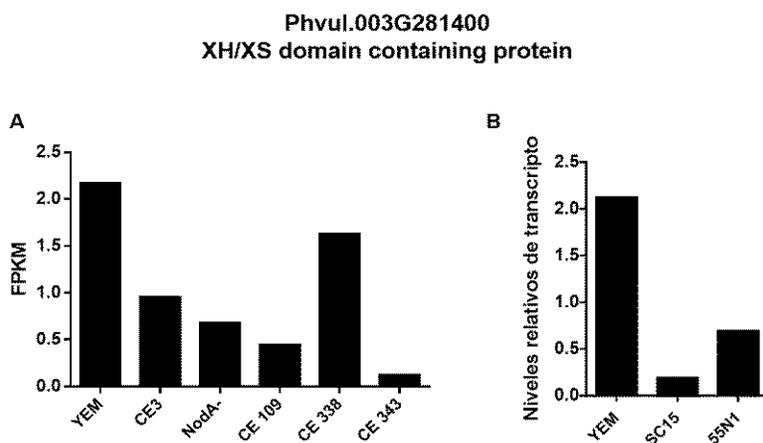


**Figura 5. Asociación simbiótica preferencial entre *P. vulgaris* y *R. etli*** Esquema de los centros de diversificación genética de *P. vulgaris*: el centro Mesoamericano, que incluye los actuales territorios de México, América central y Colombia; y el Centro Andino, que incluye Ecuador, Perú y el norte de Argentina. Los cultivares de suelos mesoamericanos establecen una asociación simbiótica más eficiente con cepas de *R. etli* portadoras del polimorfismo en el gen *nodC* de tipo  $-\alpha$ , mientras que los cultivares de la región andina lo hacen con las cepas que portan el tipo  $-\delta$ . El polimorfismo fue analizado por PCR seguido de restricción enzimática con *HinfI* (izquierda) (Aguilar et al., 2004).

## **6. Moléculas de señalización involucradas en las respuestas específicas de cepa**

Las plantas tienen la capacidad de detectar y reconocer las bacterias presentes en su entorno y en consecuencia ajustar la expresión de sus programas genéticos. La percepción de moléculas presentes en las bacterias es esencial en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno para iniciar el proceso de infección, suprimir las respuestas de defensa e iniciar el proceso de organogénesis del nódulo. Como se mencionó anteriormente, la molécula principal involucrada en estos procesos es el NF, que son lipoquitooligosacáridos decorados con grupos químicos unidos covalentemente a los extremos reductor y no reductor (D'Haese et al., 2002). Los procesos de infección regulados por NF incluyen la deformación del pelo radical, la degradación local de la pared celular y la posterior formación del IT. Además del conocido rol de NF en la simbiosis, otras moléculas asociadas a la pared celular, como los lipopolisacáridos (LPS), o secretadas por los rizobios, tal como los exopolisacáridos (EPS) y glucanos cíclicos, han sido propuestas como parte de este diálogo molecular que se establece entre la bacteria y la planta (Gibson et al., 2008; Downie, 2010; Jones et al., 2007). El uso de cepas mutantes deficientes en polisacáridos bacterianos mostró que tanto los EPS como el LPS tienen un efecto importante sobre la nodulación (Noel et al., 1986; Eisenschenk et al., 1994). Para investigar el rol de las moléculas de señalización de las bacterias en la activación de los genes de respuesta a la simbiosis, en nuestro laboratorio se realizó un estudio transcriptómico en el que se utilizaron plantas inoculadas con cepas mutantes de *R. etli* deficientes en la producción de NF, EPS o LPS. Estos estudios permitieron identificar

transcriptos diferencialmente acumulados en etapas tempranas de la simbiosis. A partir de esta información se identificó un gen que codifica para una proteína que contiene un dominio XH/XS (Phvul.003G281400). El análisis de la secuencia predicha de aminoácidos mostró homología con IDN2 (INVOLVED IN DE NOVO 2), una proteína que participa en el silenciamiento génico transcripcional mediado por siRNAs. Los datos de RNA-seq mostraron que este gen es regulado negativamente por la infección y que esta disminución de los niveles de mRNA estaría mediada por la molécula de EPS. Además, se observó que los niveles de transcripto de dicho gen decrecen frente a la infección en plantas inoculadas con cepas de rizobio con diferente eficiencia (SC15 o 55N1) (Figura 6) (Dalla Vía, Tesis de doctorado, 2014).



**Figura 6. Niveles de expresión de un gen involucrado en el silenciamiento génico postranscripcional. A.** Niveles estacionarios de transcriptos del gen *PvIDN2* (Phvul. 003G281400) en raíces de *P. vulgaris* inoculadas con medio YEM (control), con la cepa de *R. etli wild type* (CE3) o mutantes deficientes en las moléculas de señalización NF (NodA-), LPS (CE109) o EPS (CE338) y doble mutante LPS/EPS (CE343). **B.** Expresión de *PvIDN2* en plantas tratadas con YEM (control) o inoculadas con las cepas SC15 o 55N1. Datos de RNA-seq de Dalla Vía et al., 2015.

IDN2 es una proteína de 648 aminoácidos que contiene un dominio de dedos de zinc, y un dominio XS/XH separado por una región *coiled-coil*. La proteína IDN2 es capaz de unir cadenas dobles de RNA a través de su dominio XS, el cual se definió en base a una región conservada entre el gen de arroz *X* y la proteína supresora del silenciamiento 3 (XS, gen de arroz *X* y *SGS3*) (Bateman et al., 2002; Mourrain et al., 2000). La capacidad de IDN2 de unir RNA doble cadena ha sido demostrado en distintos ensayos *in vitro* (Ausin et al., 2009, 2012; Zheng et al., 2010; Zhang et al., 2012). El dominio XS se encuentra conservado en proteínas de plantas involucradas en un amplio rango de procesos, como en la defensa contra virus y respuesta a estreses (Glick et al., 2008; Qin et al., 2009). Por otro lado, se observó que 9 proteínas de *Arabidopsis* poseían además un dominio estrechamente relacionado al dominio XS localizado en la porción C-terminal al que se denominó XH (con homología al gen de arroz *X*), (Bateman, 2002). IDN2 es capaz de asociarse consigo misma y con sus parálogos IDP1 o IDP2 (IDN2 PARALOG 1 y 2) a través del dominio coiled-coil y el dominio XH, respectivamente (Ausin et al., 2012; Zhang et al., 2012). Este gen que codifica una proteína con dominio XH/XS constituye un nexo interesante entre las respuestas moleculares tempranas del rizobio y la regulación mediada por RNAs pequeños (sRNAs) a nivel transcripcional.

## **7. Vía de metilación del DNA dirigida por RNA**

Los sRNAs son RNAs no codificantes de 20 a 24 nt que regulan la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional en eucariotas (Bartel, 2009; Megraw et al., 2016, Carthew et al., 2009). Existen dos clases principales de sRNAs en plantas, que son

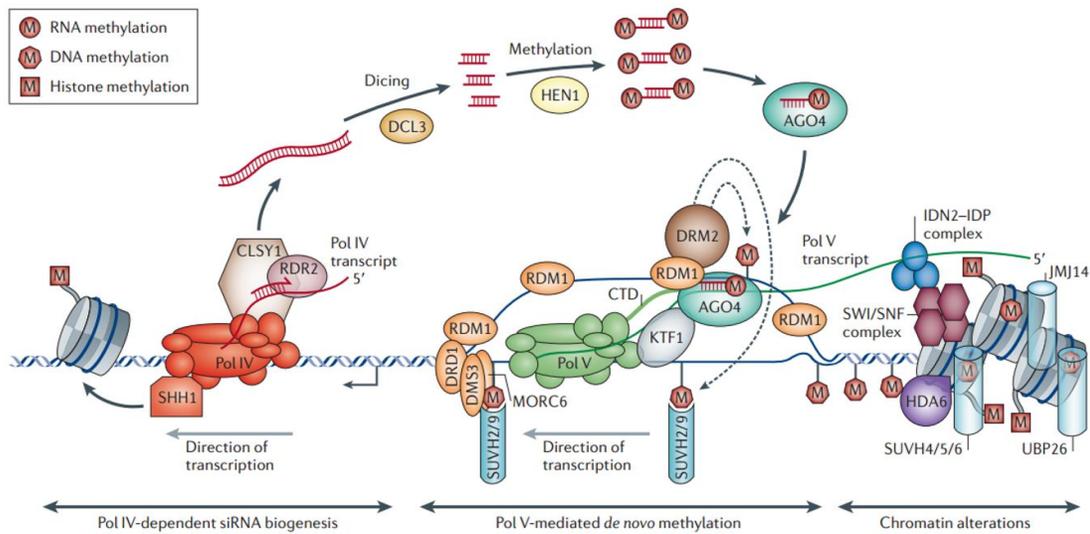
clasificados de acuerdo a su biogénesis: los microRNAs (miRNAs) y los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) (Axtell, 2013). Los miRNAs, de 21 a 22 nt de largo, son generados a partir de un precursor de RNA de simple hebra con estructura secundaria tipo horquilla. Luego de ser procesados, los miRNAs maduros inducen silenciamiento génico postranscripcional, principalmente a partir de la degradación de RNA mensajeros (Rogers et al., 2013). Por el contrario, los siRNAs son producidos a partir de precursores de RNA de doble cadena (dsRNA). Entre ellos, los siRNAs de heterocromatina (het-siRNAs) de 24 nt representan el tipo más abundante de RNA pequeños, cuya función principal es la de controlar la actividad de elementos transponibles (TEs), induciendo la metilación *de novo* del DNA por una vía conocida como metilación del DNA dirigido por RNA (RdDM) (Matzke et al., 2015; Deleris et al., 2016). Los procesos epigenéticos desencadenados por esta vía son esenciales para las respuestas adaptativas de la planta.

La metilación es un mecanismo epigenético que contribuye al silenciamiento génico transcripcional (Law et al., 2010; Castel et al., 2013; Matzke et al., 2014) y consiste principalmente en la adición de un grupo metilo a las bases citosina (C) del DNA para formar 5-metil-C. En plantas, la metilación del DNA ocurre en todos los contextos: CG, CHG y CHH (H: A, C o T) por la acción de tres DNA metiltransferasas. La metiltransferasa 1 (MET1) y la cromometilasa 3 (CMT3) son responsable del mantenimiento de la metilación en los contextos GC y CHG, respectivamente, que ocurren durante la replicación del DNA. Por otra parte, la metiltransferasa de rearrreglos de dominios 2 (DRM2) es responsable de la metilación *de novo* en todos los contextos, pero su función es más prevalente en el contexto CHH, dado que esta metilación no puede ser mantenida durante la replicación y

depende enteramente de la metilación *de novo* (He et al., 2011). La actividad de DRM2 es regulada por la vía RdDM (Figura 7). En Arabidopsis, la RdDM está involucrada en diversos procesos biológicos, como respuesta a estreses bióticos y abióticos, desarrollo y floración (Law et al., 2010; Haag et al., 2011; He et al., 2011; Kanno et al., 2011).

El mecanismo molecular de la RdDM presenta dos etapas: en primer lugar la biogénesis de los siRNAs de 24 nt y, en segundo lugar, la metilación *de novo* en los sitios complementarios a estos siRNAs. Cada etapa requiere una RNA polimerasa DNA dependiente diferente. Inicialmente, la RNA Pol IV transcribe RNAs que son copiados por una RNA polimerasa RNA dependiente (RDR2) para generar RNAs doble cadena largos con la asistencia del remodelador de cromatina CLASSY 1 (CLSY1) (Smith et al., 2007; Law et al., 2011, 2013; Zhang et al., 2013). Los dsRNAs largos son procesados por Dicer like 3 (DCL3) en siRNAs de 24 nt que son estabilizados mediante la adición de un grupo metilo en sus extremos 3' por la metiltransferasa nuclear HUA ENHANCER 1 (HEN1) (Xie et al., 2004; Zhao et al., 2012). Luego, una de las hebras del siRNA se asocia a la proteína argonauta 4 (AGO4), formando un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que es importado al núcleo. AGO4 es guiada por complementariedad de bases hacia zonas del DNA que están siendo transcritas por Pol V, principalmente transposones y DNA repetitivo (Wierzbicki et al., 2009). Al menos dos proteínas se sabe que asisten en el reclutamiento de RISC hacia los sitios *target*. Una es la ya mencionada IDN2, una proteína que fue identificada en dos *screening* genéticos independientes como un componente importante de la vía RdDM (Ausin et al., 2009; Zheng et al., 2010). IDN2, está relacionada con la unión del dsRNA y es un componente importante de la vía de silenciamiento

postranscripcional (PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing) (Ausin et al., 2012; Zhang et al., 2012), forma un complejo con el producto de sus genes parálogos *IDP1* e *IDP2* (Ausin et al., 2012; Zhang et al., 2012; Xie et al., 2012). Este complejo estabiliza la unión entre los siRNAs y Pol V (Ausin et al., 2012; Xie et al., 2012; Finke et al., 2012), facilitando la RdDM mediante la alteración de la posición del nucleosoma a través de las interacciones entre la cromatina y SWI/SNF (complejo remodelador de nucleosoma dependiente de ATP) (Zhu et al., 2013). La segunda proteína que se piensa que asiste al reclutamiento de AGO4-RISC es KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1; también conocido como RDM3 y SPT5-LIKE) (Bies-Etheve et al., 2009; He et al., 2009; Huang et al., 2009). Por último, la DNA metiltransferasa DRM2 es reclutada al complejo para mediar la metilación *de novo* de citosinas (Wierzbicki et al., 2009). La vía RdDM media también la remoción de marcas activadoras y el establecimiento de marcas represivas por modificación postraducciona l de histonas y el posicionamiento de los nucleosomas mediante el reclutamiento del complejo de remodelación de la cromatina (Haag et al., 2011).



**Figura 7. Vía de metilación del DNA dirigida por RNA.** A la izquierda de la figura se representa la biogénesis de siRNAs. La RNA polimerasa Pol IV transcribe un ssRNA que es copiado en un dsRNA por acción de la polimerasa RDR2 con la asistencia del remodelador de cromatina CLASSY 1 (CLSY1). El dsRNA es procesado por DCL3 en siRNAs de 24 nt que son metilados en sus extremos 3' por HEN1 y cargados en AGO4. SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1 (SHH1), el cual une histona H3 metilada en lisina 9 (H3K9me), interactúa con Pol IV y la recluta hacia algunos *loci*. En la parte central de la figura se muestra la metilación *de novo* mediada por Pol V. La RNA polimerasa Pol V transcribe un andamiaje de RNA que se aparea por complementariedad de bases con los siRNAs unidos a AGO4. AGO4 es reclutada a través de interacciones con el dominio carboxiterminal de la subunidad mayor de Pol V y con KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1). RDM1 une a AGO4 y DRM2, la cual cataliza la metilación *de novo* del DNA. La transcripción de Pol V es asistida por DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) y DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) y RDM1 (REQUIRED FOR DNA METHYLATION 1). El reclutamiento de Pol V es potencialmente ayudado por SUVH2 o SUVH9, los cuales se unen al ADN metilado. A la derecha se esquematiza el cambio en la cromatina generado por esta vía. El posicionamiento del nucleosoma es ajustado por el complejo SWI/SNF, que interactúa con el complejo IDN2-IDP que se une a los RNA *scaffold* de Pol V. Adaptada de Matzke y Mosher (2014).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 1. Hipótesis de trabajo y objetivo general

La agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos para mantener altas producciones agrícolas. Sin embargo, la utilización excesiva de fertilizantes ha impactado negativamente en el medio ambiente. La fijación biológica de nitrógeno (FBN), constituye una alternativa ecológica y económica sustentable para la incorporación de compuestos nitrogenados al suelo. Para ello es necesario, por un lado, mejorar la fijación biológica a través de la optimización de la interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios, y por otro, transferir la capacidad de fijación de nitrógeno a cereales de alta importancia agronómica. Las leguminosas de grano, utilizadas para el consumo humano y de ganado, incluyen las especies de mayor interés comercial, tanto a nivel global como local. El poroto es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano, representando el 50% del consumo mundial de legumbres. En los últimos años, en nuestro grupo de investigación hemos avanzado en el estudio de los genes de poroto vinculados al proceso de nodulación. Estos estudios han permitido identificar nuevos genes vinculados a la simbiosis, tanto en la organogénesis del nódulo como en la infección bacteriana. Estudios transcriptómicos nos han permitido identificar transcritos que se acumulan diferencialmente en respuesta a cepas de rizobio que son seleccionados por la planta y que presentan una mayor eficiencia simbiótica. A partir de esta información se identificaron RNAs no codificantes pequeños (miRNAs y siRNAs) (Castaingts., 2022), RNAs no codificantes largos (lncRNAs) y mRNAs que codifican proteínas que participan del silenciamiento postranscripcional (Dalla Via et al., 2015; Clúa et al., 2022).

La hipótesis de este trabajo es que tanto las ciclinas como el silenciamiento transcripcional mediado por pequeños RNAs son importantes para el establecimiento de la interacción simbiótica entre poroto y *R. etli*.

El objetivo general del presente trabajo es contribuir al entendimiento de las bases moleculares que constituyen el programa simbiótico entre leguminosas y rizobios.

## **2. Objetivos específicos**

En base al objetivo general y la hipótesis planteada se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar la función de *PvIDN2* en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno y evaluar el efecto del silenciamiento de *PvIDN2* sobre la vía de metilación del DNA dirigida por RNA.
- 2- Caracterizar funcionalmente mediante genética reversa el gen *PvCYCP4-1*, en el crecimiento y desarrollo de la raíz y durante la simbiosis en *P. vulgaris*.

# **CAPÍTULO I**

**Análisis funcional del gen *PvIDN2*, involucrado  
en la vía de metilación del DNA dirigida por RNA**

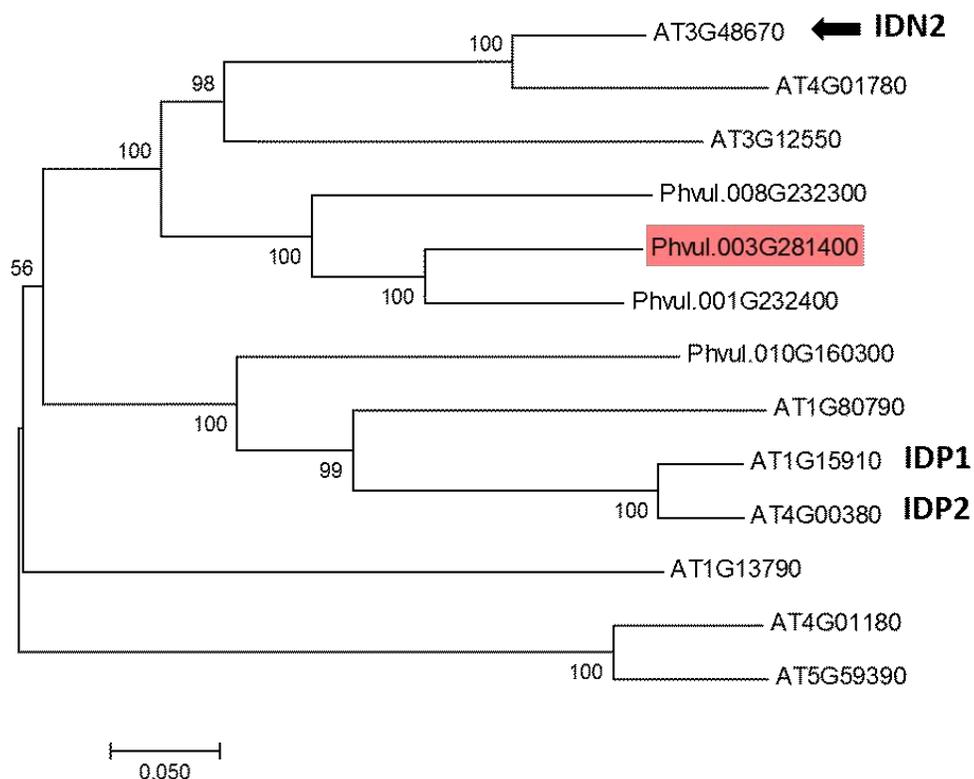
# RESULTADOS

En este capítulo se describe el estudio del gen Phvul.003G281400, que codifica para una proteína con dominios XH/XS homóloga a IDN2. Con el propósito de conocer la función de este gen durante la infección de la raíz y la organogénesis del nódulo, se propuso investigar su función biológica mediante genética reversa.

## **1. Análisis filogenético de la familia de proteínas con dominio XH/XS de *A.***

### ***thaliana* y *P. vulgaris***

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas del gen Phvul.003G281400 dentro de la familia de proteínas que contienen dominios XH/XS se identificaron todos los miembros de *A. thaliana* y de *P. vulgaris* mediante búsquedas por homología de secuencias. La construcción de un árbol filogenético utilizando la secuencia de aminoácidos de estas proteínas mostró que la proteína codificada por el gen Phvul.003G281400 se agrupa dentro del mismo clado que IDN2 de *Arabidopsis* (AT3G48670), una proteína de unión a RNA doble cadena involucrada en la vía RdDM (Figura 8).



**Figura 8.** Árbol filogenético de la familia de proteínas con dominio XH/XS de *A. thaliana* y *P. vulgaris* obtenido mediante el método Neighbor-joining utilizando un *bootstrap* de 1000 iteraciones. La proteína codificada por el gen Phvul.003G281400 de *P. vulgaris* está resaltada en color rosa. IDN2 de Arabidopsis se encuentra señalada por una flecha de color negro y las proteínas que interactúan con IDN2, AT1G15910 (IDP1) y AT4G00380 (IDP2) están resaltadas en negra.

Dado que el gen Phvul.003G281400, se agrupa dentro del mismo clado que otros dos genes de *P. vulgaris*, Phvul.008G232300 y Phvul.001G232400 y 3 miembros de *A. thaliana*, AT3G48670 (IDN2), AT4G01780, AT3G12550 (Figura 8), se analizó el porcentaje de identidad y el *total score* de un análisis de BLAST (Altschul et al., 1990) entre las proteínas codificadas por estos tres miembros de *P. vulgaris* con aquellas codificadas por los genes de *A. thaliana* (Tabla 1). El valor de *total score* refleja la cantidad de aminoácidos comunes en cada posición y el % de identidad es la cantidad de aminoácidos que son idénticos entre ambas secuencias.

**Tabla 1.** Valor de *total score* y % de identidad entre las proteínas codificadas por los genes Phvul.003G281400 (PvIDN2), Phvul.008G232300 y Phvul.001G232400 de *P. vulgaris* y AT3G48670 (IDN2), AT4G01780, AT3G12550 de *A. thaliana*.

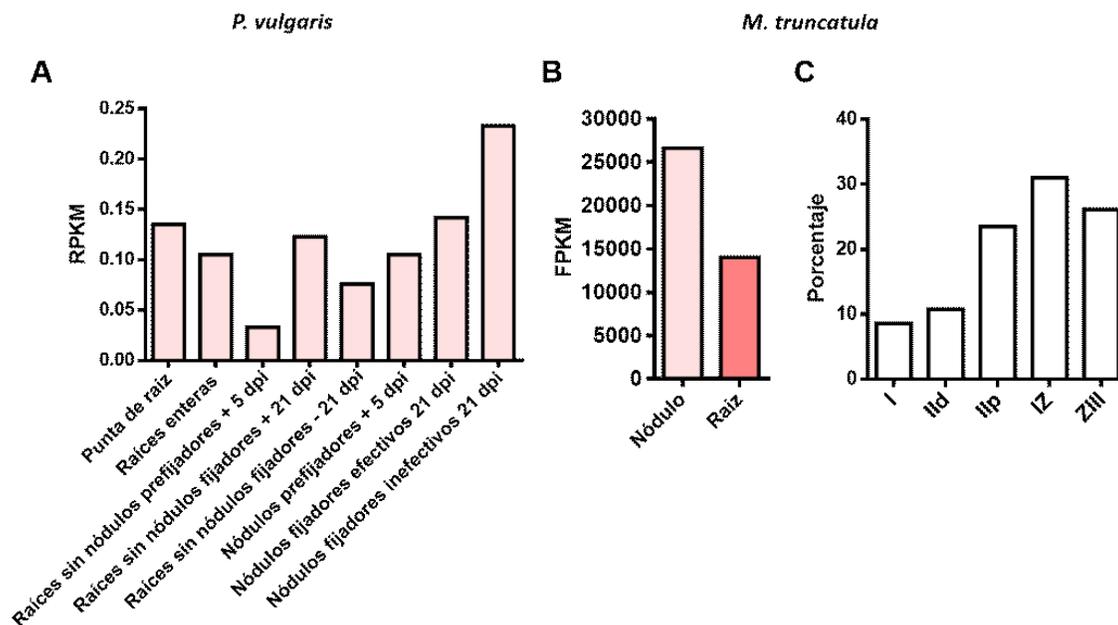
	<b>AT3G48670 (IDN2)</b>	<b>AT3G12550</b>	<b>AT4G01780</b>
<b>Phvul.003G281400</b>	<i>Total score:</i> 653 % de Identidad: 53.9	<i>Total score:</i> 572 % de Identidad: 48.4	<i>Total score:</i> 348 % de Identidad: 41.6
<b>Phvul.001G232400</b>	<i>Total score:</i> 677 % de Identidad: 54.3	<i>Total score:</i> 615 % de Identidad: 50.9	<i>Total score:</i> 376 % de Identidad: 41.7
<b>Phvul.008G232300</b>	<i>Total score:</i> 634 % de Identidad: 54.1	<i>Total score:</i> 586 % de Identidad: 51.2	<i>Total score:</i> 359 % de Identidad: 41.9

Los porcentajes de similitud de secuencia y los *total score* entre las proteínas codificadas por Phvul.003G281400, Phvul.003G281400 y Phvul.008G232300 de poroto, e IDN2 (AT3G48670) de Arabidopsis son muy similares y no permiten establecer con claridad las relaciones evolutivas entre los genes codificados en los genomas de ambas especies. Un estudio de la ontogenia entre estos genes mediante sintenia no mostró un entorno común que permita establecer relaciones de ortología (resultado no mostrado). Si bien este resultado es esperable por la distancia evolutiva entre ambas especies, el análisis en su conjunto sugiere que esta familia génica podría haber evolucionado a través de eventos de duplicación génica independientes en los antecesores de cada una de las especies. En función de este análisis y de los resultados mostrados más adelante decidimos nombrar al gen Phvul.003G281400 como *PvIDN2* y a la proteína producida como PvIDN2.

## 2. Análisis de la expresión de *PvIDN2* durante el desarrollo de nódulos y raíces

Haciendo uso de las bases de datos de expresión disponibles públicamente, se caracterizó la expresión de *PvIDN2*. En primer lugar analizamos los datos de expresión depositados en el atlas de expresión génica de poroto (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>) (O'Rourke et al., 2014). Los resultados muestran que *PvIDN2* se expresa tanto en raíces como en nódulos de plantas de 5 y 21 días *post* inoculación (dpi), aunque los valores de expresión máximos se observan en los nódulos fijadores inefectivos, es decir nódulos colonizados con bacterias incapaces de fijar nitrógeno a los 21 dpi (Figura 9A). Por otra parte, datos de RNA-seq reportados por Roux et al. (2014) muestran que el mejor homólogo de *PvIDN2* en *M. truncatula* (Medtr3g067815) se expresa mayoritariamente en nódulos de 15 días (Figura 9B); y principalmente en las zonas de fijación proximal, interzona y zona de fijación de nitrógeno del nódulo obtenidas por microdissección láser (Figura 9C).

Estos resultados muestran que si bien existe una disminución de los niveles de *PvIDN2* a tiempos tempranos de la interacción simbiótica, el nódulo como órgano diferenciado exhibe niveles mayores de *PvIDN2* que el tejido de la raíz tanto en nódulos de tipo determinado como los formados en *P. vulgaris* como en los nódulos de tipo indeterminado formados en *M. truncatula*, sugiriendo que *PvIDN2* podría cumplir un rol durante etapas más tardías de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios.

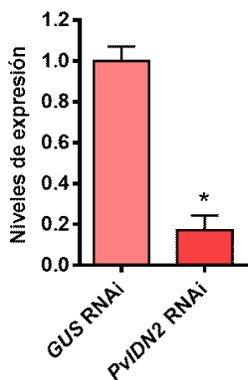


**Figura 9. Análisis de expresión del gen *IDN2* en *P. vulgaris* y *M. truncatula*.** A. Datos de expresión de *PvIDN2* en punta de raíz, raíces enteras, raíces a la cual se le quitaron los primordios de nódulos (raíces sin nódulos prefijadores + de 5 dpi), raíces a la cual se le quitaron los nódulos fijadores efectivos e inefectivos de 21 dpi. También se muestran nódulos fijadores efectivos de 21 dpi (nódulos colonizados por bacterias capaces de fijar nitrógeno de 21 dpi) y nódulos fijadores inefectivos de 21 dpi (nódulos colonizados por bacterias incapaces de fijar nitrógeno de 21 dpi). Los datos fueron obtenidos a partir del atlas de expresión génica de poroto (O'Rourke et al., 2014). Los valores están expresados en lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (RPKM: Reads Per Kilobase per Million) para diferentes tejidos de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. B. Niveles de acumulación del homólogo de *PvIDN2* en *M. truncatula* (Medtr3g067815) en nódulos y raíces 15 dpi con *S. meliloti*. (FPKM: Fragments Per Kilobase per Million) C. Niveles de expresión de Medtr3g067815 en diferentes zonas de nódulos de 15 dpi. I: Zona meristemática; IId: zona de infección distal; IIp: es la zona de infección proximal; IZ: interzona y ZIII: zona de fijación de nitrógeno. Los datos de B y C fueron generados por RNA-seq (Roux et al. 2014).

### 3. Obtención de plantas compuestas con niveles reducidos de *PvIDN2*

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente a *PvIDN2* en el contexto de la nodulación, se decidió llevar a cabo el silenciamiento postranscripcional mediado por RNA de interferencia (RNAi). El análisis por RT-qPCR de los niveles de transcritos generados a partir de Phvul.003G281400 en raíces transformadas con la construcción *PvIDN2* RNAi mostró una reducción de más del 80 % en los niveles de transcritos de *PvIDN2* respecto a

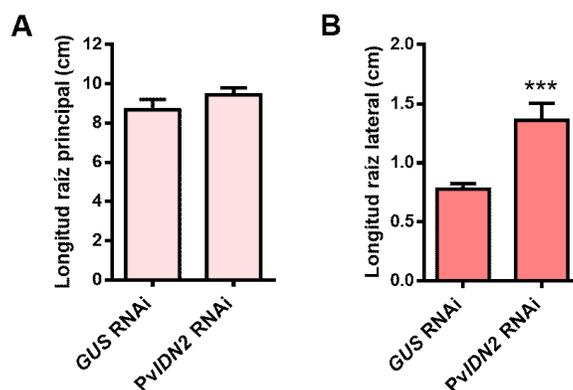
raíces que fueron transformadas con la construcción control *GUS* RNAi (Figura 10). Este resultado muestra que la estrategia de RNAi fue exitosa para iniciar la caracterización de la función biológica de *PvIDN2*.



**Figura 10. Silenciamiento postranscripcional de *PvIDN2*.** Niveles de expresión relativa de *PvIDN2* en plantas transformadas con la construcción *PvIDN2* RNAi o *GUS* RNAi como control. Los resultados son la media de tres repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. El asterisco indica diferencias significativas respecto al control en un t-test con  $p < 0,05$  (\*). Los datos fueron normalizados respecto a los valores de expresión de *EF1 $\alpha$*  y expresados en relación a *GUS* RNAi. El resultado es representativo de 3 réplicas biológicas.

#### 4. Evaluación del efecto del silenciamiento de *PvIDN2* sobre la arquitectura de raíz, la organogénesis del nódulo y la infección por *R. etli*

Con el objetivo de determinar la función biológica de *PvIDN2* en la raíz se se cuantificó la longitud de las raíces principales y laterales en plantas compuestas transformadas con las construcciones *PvIDN2* RNAi y *GUS* RNAi como control. La reducción de los niveles de *PvIDN2* no afectó el crecimiento ni el desarrollo de la raíz principal (Figura 11A). Sin embargo, la longitud de las raíces laterales fue significativamente mayor en las plantas *PvIDN2* RNAi con respecto al control (Figuras 11B). Por lo tanto, el silenciamiento de *PvIDN2* estaría afectando la elongación y desarrollo de las raíces laterales

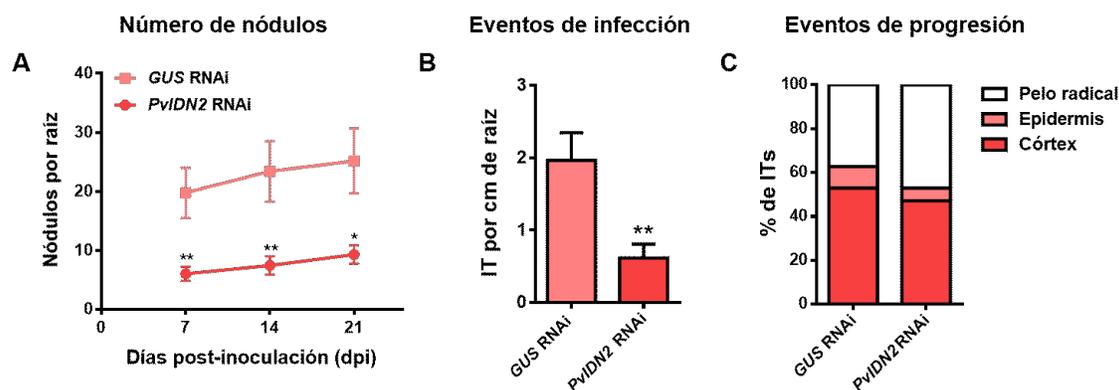


**Figura 11. Análisis fenotípico de la arquitectura de raíz de plantas *GUS RNAi* y *PvIDN2 RNAi*.** La longitud de las raíces principales (**A**) y las raíces laterales (**B**) fue cuantificada en raíces *GUS RNAi* y *PvIDN2 RNAi*. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar y son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 raíces transgénicas por ensayo. Los asteriscos indican que los valores de *PvIDN2 RNAi* son significativamente diferentes de los *GUS RNAi* en un *test* t-Student no apareado de dos colas con  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Para analizar la posible función de *PvIDN2* en el establecimiento de la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno, se evaluó el efecto de su silenciamiento sobre la formación de nódulos. Como se muestra en la figura 12A, la expresión de *PvIDN2 RNAi* causó una reducción significativa en el número de nódulos formados por *R. etli* a todos los tiempos analizados (7, 14 y 21 dpi), sugiriendo que *PvIDN2* es requerido para la organogénesis del nódulo.

Teniendo en cuenta que las raíces con niveles disminuidos de *PvIDN2* mostraron una menor cantidad de nódulos, nos preguntamos si la causa de este fenotipo podría estar asociada a fallas en el proceso de infección bacteriana. Para determinar esto, plantas compuestas de *P. vulgaris* fueron inoculadas con la cepa CFNX5 de *R. etli* que expresa la proteína fluorescente DsRed, previamente obtenida en nuestro laboratorio (Battaglia et al., 2014). La cuantificación de la densidad de IT mediante microscopía de epifluorescencia muestra que las raíces *PvIDN2 RNAi* presentaron una reducción cercana al 75 % en la

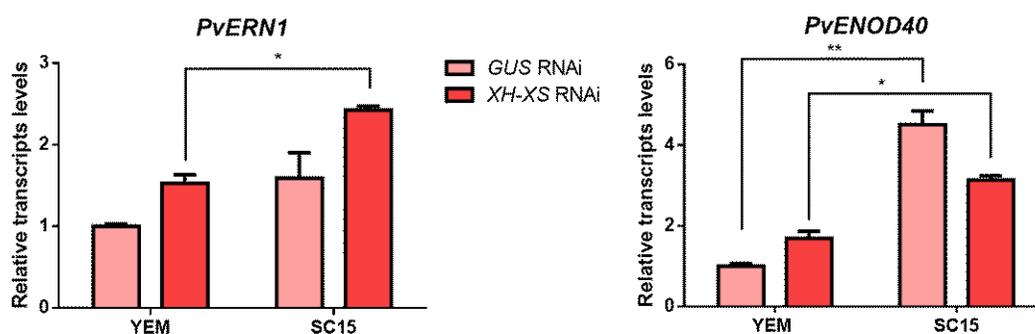
cantidad de ITs respecto de las raíces control *GUS* RNAi (Figura 12B). Para analizar la progresión de la infección, los eventos de infección fueron clasificados según su posición en aquellos que se encuentran en el pelo radical, los que alcanzaron la base del tricoblasto o se desviaron a células epidérmicas vecinas (epidermis) o aquellos que progresaron hasta alcanzar células corticales. Los resultados no revelaron diferencias significativas en el grado de progresión de los IT entre plantas control y las plantas que expresan las construcciones *PvIDN2* RNAi (Figura 12C). Estos resultados sugieren que *PvIDN2* es requerido para la iniciación de los eventos de infección, pero no así para la progresión de los IT hacia las células corticales.



**Figura 12. Efecto del silenciamiento de *PvIDN2* en la nodulación e infección por rizobios.** **A.** Número de nódulos formados por raíz en plantas compuestas *GUS* RNAi (control) y *PvIDN2* RNAi frente a la inoculación con la cepa de *R. etli* SC15. Se evaluaron al menos 35 raíces por réplica y condición. **B.** Número de ITs formados por centímetro de raíz en plantas compuestas *PvIDN2* RNAi o *GUS* RNAi a los 5 dpi con una cepa de *R. etli* que expresa la proteína DsRed. **C.** Porcentaje de eventos de infección que se encuentran detenidos en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces *PvIDN2* RNAi o *GUS* RNAi a los 5 dpi. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM y los asteriscos indican que los valores de *PvIDN2* RNAi son estadísticamente diferentes respecto al control *GUS* RNAi en un *t*-test (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas independientes.

## 5. El silenciamiento de *PvIDN2* no altera los niveles de transcritos de los genes de respuesta temprana *ENOD40* y *ERN1*

Con el objetivo de explorar si *PvIDN2* es requerido para la activación de respuestas moleculares de leguminosas frente a la infección rizobiana, se analizó la expresión de los genes de nodulación temprana *ERN1* (*Ethylene Response Factor Required for Nodulation*), un factor de transcripción de tipo AP2 que es requerido para la formación del IT y la invasión del nódulo (Middleton et al., 2007) y *ENOD40* (*Early Nodulation gene 40*), que codifica un RNA implicado en la formación del primordio de nódulo (Crespi et al., 1994). La cuantificación de los niveles de acumulación de los dos genes se realizó mediante RT-qPCR en raíces *PvIDN2* RNAi y en raíces control transformadas con *GUS* RNAi, inoculadas con YEM o con la cepa SC15 de *R. etli* al cabo de 24 hpi. De acuerdo a lo esperado, se observó un aumento en los niveles de ambas nodulinas en respuesta a la inoculación en las plantas control (Figura 13). El silenciamiento de *PvIDN2* no afectó la expresión de las nodulinas *ERN1* y *ENOD40* en respuesta al rizobio, sugiriendo que los efectos del silenciamiento de *PvIDN2* sobre la infección no involucran estos genes tempranos de nodulación.



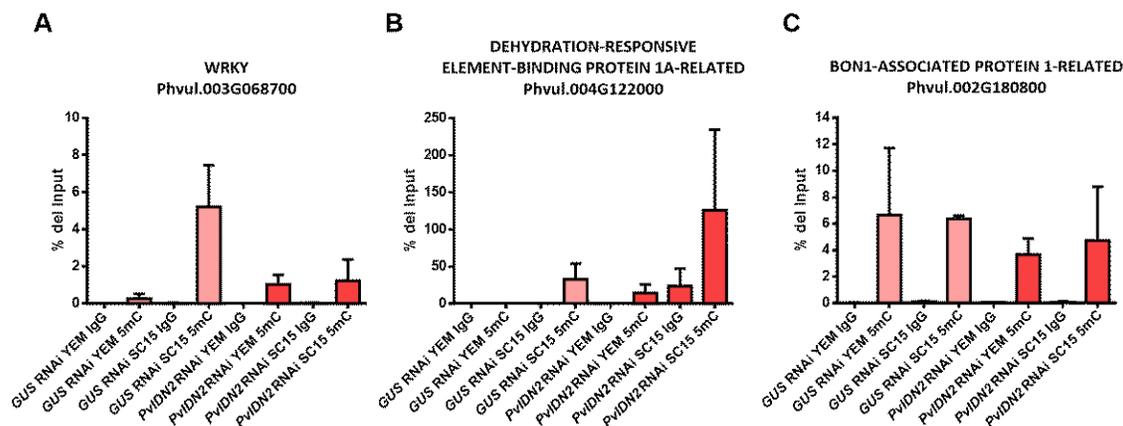
**Figura 13. Expresión de genes marcadores de nodulación temprana en las raíces *GUS* RNAi y *PvIDN2* RNAi.** Niveles de transcripto de los genes de nodulación temprana *ERN1* y *ENOD40* en raíces *GUS* RNAi y *PvIDN2* RNAi inoculadas con *R. etli* SC15 o con medio de crecimiento para rizobios (YEM) como control a las 24 hpi. La expresión de los genes indicados se determinó mediante RT-qPCR. Los valores fueron normalizados con los niveles de expresión de *PvEF1 $\alpha$* , y se expresaron en relación a los valores de las raíces control de *GUS* RNAi. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de dos réplicas biológicas. Los asteriscos indican que los valores de las muestras son significativamente diferentes entre sí en un t- test no apareado de dos colas con (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

## 6. Caracterización de los cambios en el estado de la metilación del DNA en plantas *PvIDN2* RNAi

Teniendo en cuenta que la proteína IDN2 de *A. thaliana* participa en el proceso de metilación del DNA guiada por RNA y que plantas mutantes *idn2* de *Arabidopsis* exhiben niveles de metilación de citosinas alterados en todos sus contextos (CG, CHG y CHH) (Ausin et al., 2009), nos propusimos identificar cambios en los niveles de metilación del DNA como consecuencia del silenciamiento de *PvIDN2* en *P. vulgaris* en el contexto de la infección rizobiana. A partir de bibliotecas generadas en nuestro laboratorio de RNAs pequeños (sRNAs) de plantas de poroto de la variedad Mesoamericana NAG12 24 hpi con la bacteria más eficiente *R. etli* SC15, con la bacteria menos eficiente 55N1 o con medio YEM como control (Castaingts et al., 2022), se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) de 24 nucleótidos que actúan a nivel de la cromatina promoviendo su compactación (denominados hetsiRNAs, por siRNAs de heterocromatina) (resultados no publicados, Artunián, Reynoso, Blanco). Se identificaron 236 picos de hetsiRNAs diferencialmente acumulados, de los cuales 25 están próximos a genes regulados en respuesta a la cepa *nodC- $\alpha$*  (SC15) o *nodC- $\delta$*  (55N1). Algunos de estos genes codifican para factores de transcripción o respuestas de defensa, aunque la mayoría

son no codificantes o codifican para proteínas que tienen función desconocida. Se seleccionaron aquellos hetsiRNAs que son regulados en respuesta a las cepas específicas de rizobio y que se encuentran próximos a genes regulados diferencialmente en las mismas condiciones a partir de datos de transcriptómica (Clúa et al, 2022). Considerando que los hetsiRNAs producen la represión transcripcional mediada por modificaciones postraduccionales de las histonas y la metilación del DNA por la vía RdDM (Matzke et al., 2014), se estudió el nivel de metilación de esos *loci* mediante la técnica de Inmunoprecipitación de ADN metilado (Methylated DNA Immunoprecipitation, MeDIP) seguido de PCR cuantitativo en plantas *PvIDN2* RNAi y *GUS* RNAi inoculadas con *R. etli* SC15 a 24 hpi o con medio YEM como plantas control.

La metilación de la región río arriba del gen Phvul.003G068700 aumentó en respuesta a la cepa de rizobio más eficiente SC15 a las 24 horas de la inoculación (Figura 14A). Se determinó que el silenciamiento postranscripcional mediado por RNAi de *PvIDN2* suprimió este aumento de la metilación (Figura 14A), sugiriendo que *PvIDN2* participaría en la metilación *de novo* de este *locus* mediante la vía RdDM en forma similar a su proteína homóloga de Arabidopsis.



**Figura 14. Efecto del silenciamiento de *PviDN2* sobre la metilación del DNA en los *loci* de *P. vulgaris* Phvul.003G068700, Phvul.004G122000 y Phvul.002G180800.** Nivel de metilación de las regiones río arriba de los genes Phvul.003G068700, Phvul.004G122000 y Phvul.002G180800 estimado mediante la técnica de Inmunoprecipitación de ADN metilado (Methylated DNA Immunoprecipitation, MeDIP) seguido de PCR cuantitativo en plantas *PviDN2* RNAi y *GUS* RNAi inoculadas con *R. etli* SC15 a 24 hpi o con medio YEM como control. La cromatina fue inmunoprecipitada con anticuerpo contra metil citosinas (5mC) o con IgG como control. El enriquecimiento de cada inmunoprecipitación fue determinado calculando el porcentaje de DNA cuantificado en cada muestra con respecto al DNA Input. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de tres réplicas biológicas.

La región promotora del gen Phvul.004G122000 también mostró un aumento de la metilación en respuesta a la infección. Esta diferencia también fue observada en raíces que expresan el RNAi de *PviDN2* (Figura 14B). En el caso de un tercer gen, Phvul.002G180800, si bien se había detectado un aumento en los niveles de transcritos, no se observaron cambios en la metilación del locus en respuesta al rizobio ni un efecto del silenciamiento de *PviDN2* (Figura 14C). En conjunto, los resultados indican que la infección con rizobios produce cambios en la metilación del DNA y que *PviDN2* participaría en este proceso en uno de los 3 *loci* estudiados (Phvul003G068700), mientras que en los otros dos casos no hubo correlación entre lo observado en la acumulación de hetsiRNAs y

la metilación de citosinas (Phvul.002G180800) o no se afectó el cambio en la metilación por el silenciamiento de *PvIDN2* (Phvul004G122000).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en un ensayo de transcriptómica realizado con cepas mutantes de *R. etli* en plantas de poroto mostraron que la regulación génica transcripcional podría cumplir un rol en las etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Dalla Vía et al., 2015). Por esta razón decidimos estudiar un gen involucrado en la regulación génica mediada por sRNAs que codifica una proteína que contiene dominios XH/XS, cuya expresión era reprimida por cepas salvajes de *R. etli*, pero no por una cepa mutante en la producción de EPS. El descubrimiento de pequeños RNA (sRNAs) ha sido clave para investigar mecanismos de regulación en la nodulación (Boualem et al., 2008; Subramanian et al., 2008). Los sRNAs son moléculas de 20-24 nts que actúan como reguladores transcripcionales o postranscripcionales de la expresión génica. En esta categoría se encuentran dos tipos de sRNAs en plantas: los miRNAs y los siRNAs (Axtell, 2013). Ensayos filogenéticos con proteínas que contienen dominios XH/XS de *P. vulgaris* y *Arabidopsis* mostraron que la proteína codificada por este gen posee una alta similitud de secuencia aminoacídica con IDN2 de *Arabidopsis*, sugiriendo que podría formar parte de la ruta de regulación de la metilación del DNA mediada por pequeños RNAs (Figura 8 y Tabla 1). Por otra parte, la caracterización funcional del gen *PvIDN2* mostró que este es requerido para la metilación del DNA aguas arriba del gen Phvul.003G068700, que codifica para un factor de transcripción de tipo WRKY (Figura 14A). Este *locus* muestra a su vez la acumulación diferencial de hetsiRNAs, lo que sugiere que su regulación podría estar mediada por la ruta de RdDM. Datos transcriptómicos muestran que el gen Phvul.003G068700 aumenta

fuertemente su expresión a las 24 hpi con las cepas SC15 y 55N1 de *R. etli* (Dalla Vía, Tesis de doctorado, 2014), indicando que los datos observados a nivel de metilación en el contexto de la nodulación se correlacionan con los niveles de mRNA de este gen. Este ensayo es una fuerte evidencia de que P*VIDN2* sería el homólogo funcional de *IDN2* de *Arabidopsis* y que por lo tanto participaría de la regulación génica a través de la metilación del DNA y la compactación de la cromatina. A su vez, el resultado sugiere que, al igual que en el caso de *Arabidopsis*, no existiría redundancia funcional con los otros dos genes del clado, Phvul.008G232300 y Phvul.008G232400, aunque para corroborar esta conclusión sería necesario medir los niveles de mRNA de estos dos genes en las raíces *IDN2* RNAi. En el mismo sentido, plantas de *Arabidopsis* mutantes en *IDN2* mostraron un fenotipo de floración tardía, sugiriendo que dicho gen no exhibe redundancia funcional con sus parálogos (Ausin et al, 2009).

Los análisis funcionales mediante genética funcional mostraron que la disminución de los niveles de *PVIDN2* causados por la expresión de un RNAi generaron una reducción de los nódulos formados y de la densidad de hilos de infección respecto al control (Figura 12), sugiriendo que la regulación transcripcional mediada por hetsiRNAs es necesaria para el establecimiento de la simbiosis entre rizobios y leguminosas. La medición de dos genes que se inducen en etapas tempranas de la nodulación sugiere que la interferencia con la metilación *de novo* del DNA no compromete las respuestas moleculares iniciales que dan origen a la reprogramación génica en la raíz (Figura 13). Es posible que *PVIDN2* cumpla una función más tardíamente en el nódulo, según sugiere el aumento de sus niveles de RNA en ese órgano en comparación con lo observado en raíces no inoculadas (Figura 9B).

El silenciamiento de *PvIDN2* también afectó el crecimiento de las raíces laterales (Figura 11). A diferencia de lo observado en el contexto de la nodulación, donde la disminución de los niveles de *PvIDN2* resultó en una disminución de los nódulos formados, en este caso se observó un aumento de la longitud de las raíces laterales, sugiriendo que la metilación de algún/os *locus/loci* afecta negativamente el crecimiento de las raíces laterales, sin afectar al crecimiento de la raíz principal.

Los resultados obtenidos muestran la relación entre un componente de la vía del RdDM y la formación de dos órganos postembrionarios de la raíz, el nódulo y la raíz lateral. Este resultado indica que la reprogramación génica de células ya diferenciadas para formar un nuevo órgano involucraría entonces el nivel de regulación transcripcional mediada por la reconfiguración de la cromatina en *loci* determinados. Resultados recientes obtenidos en *M. truncatula* mediante la técnica de bisulfito seguida de secuenciación masiva del DNA demostraron la importancia de la metilación de DNA en el contexto CHH mediada por la DNA metiltransferasa DMR2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) para la diferenciación de nódulos fijadores de nitrógeno (Pécricx et al, 2022), sustentando la importancia de la vía RdDM para la formación de nódulos funcionales fijadores de nitrógeno. En este sentido, la secuenciación del DNA mediante la técnica del bisulfito o el uso de MeDIP-seq en raíces que expresan *PvIDN2* RNAi o *GUS* RNAi permitirá identificar las regiones del genoma que son metiladas diferencialmente y los contextos de metilación modificados en diferentes etapas de la formación de nódulos determinados en *P. vulgaris*.

# **CAPÍTULO II**

**Caracterización funcional de la ciclina P, un  
target transcripcional directo de *NF-YC1***

# RESULTADOS

Diversos miembros de la familia de factores de transcripción NF-Y han sido implicados en diferentes estadios de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Estudios previos han demostrado que los factores de transcripción NF-YA1, NF-C1 y SIN1 juegan roles claves durante el desarrollo del nódulo y la infección bacteriana modulando la expresión de genes del ciclo celular de la transición G2/M (Zanetti et al., 2010; Rípodas et al., 2014; Battaglia et al., 2014; Rípodas et al., 2019). Como se mencionó en la introducción, NF-YC1 de poroto interacciona directamente con el promotor de una ciclina de tipo P. El presente capítulo de este trabajo tuvo como objetivo caracterizar funcionalmente el rol del gen *PvCYCP4-1* durante el desarrollo la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* y *R. etli*, para lo cual se llevaron a cabo análisis filogenéticos, de expresión y estudios de genética reversa.

## **1. Análisis filogenético de la familia de ciclinas de *P. vulgaris***

### **1.1. Identificación de los genes de ciclina en *P. vulgaris***

Los miembros de las familias de ciclinas de poroto fueron identificados a través de búsquedas tBLASTp y tBLASTn contra el genoma de *P. vulgaris* v2.1 utilizando como *queries* las secuencias de aminoácidos de las ciclinas de *A. thaliana* anotadas y clasificadas. El genoma de *A. thaliana* codifica 49 ciclinas, las cuales han sido divididas en 10 subgrupos en base a un análisis de secuencia y función (Wang et al., 2004).

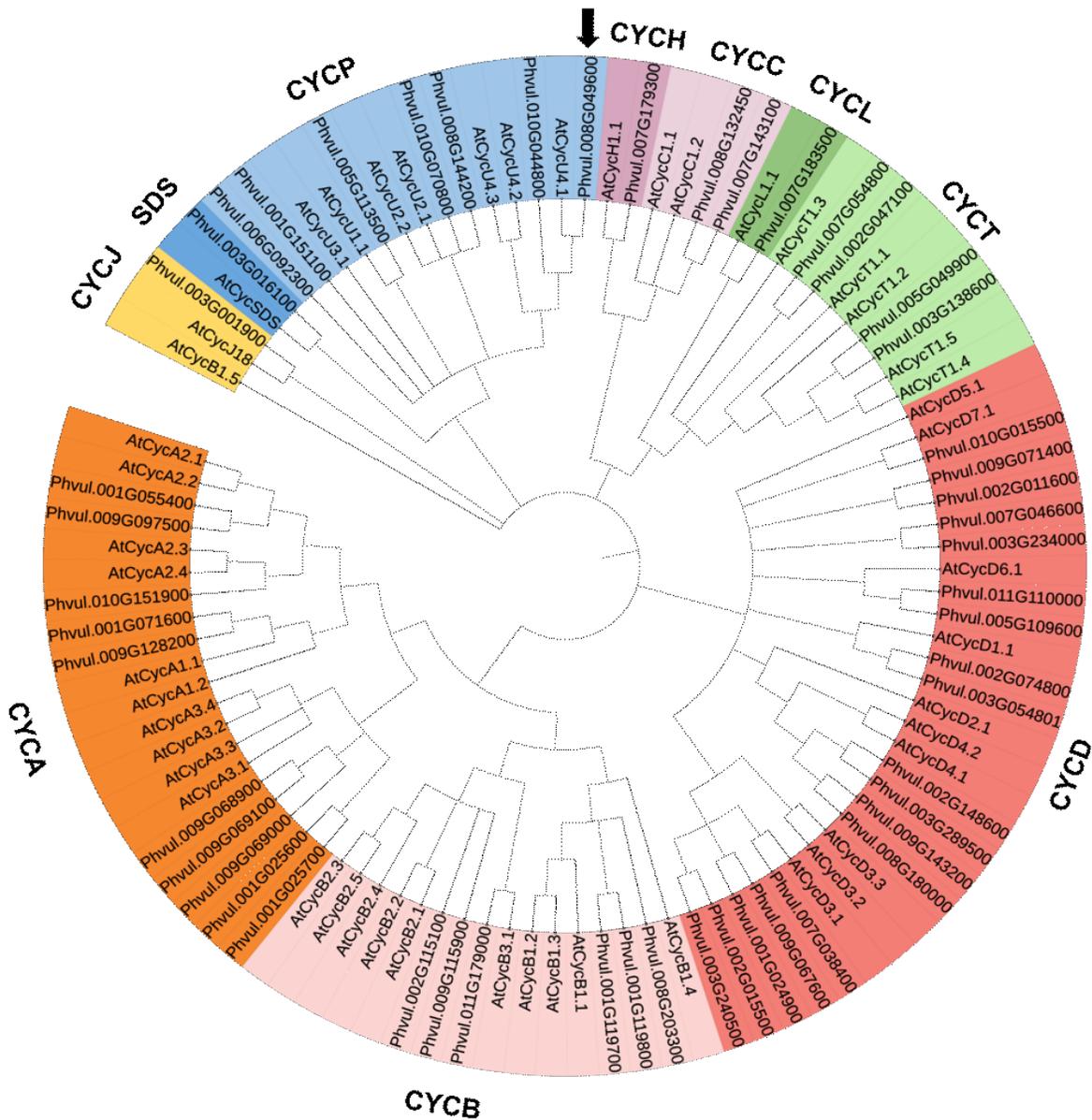
Las ciclinas se caracterizan por tener una región altamente conservada de 250 aminoácidos, llamada *cyclin core* (Nugent et al., 1991), que contiene dos dominios: ciclina\_N y ciclina\_C. El dominio ciclina\_N tiene el sitio de unión a quinasas dependientes

de ciclinas (cyclin-dependent kinase, CDK) y se encuentra en todas las ciclinas conocidas. El dominio ciclina\_C es menos conservado. Se sabe que algunas ciclinas, tales como las ciclinas G1 y G2 de humanos, tienen el dominio ciclina\_N pero no el dominio ciclina\_C (Horne et al., 1996), sugiriendo que el dominio ciclina\_C no sería crítico para la función de las ciclinas. Por lo tanto, para realizar nuestro análisis filogenético, decidimos conservar solo aquellos candidatos que contengan el dominio ciclina\_N, para lo cual tuvimos en cuenta la anotación funcional y descripción asociada al genoma en Phytozome v13. De esta manera, luego de remover las secuencias redundantes, identificamos un total de 51 ciclinas en *P. vulgaris*.

## **1.2. Análisis Filogenético y clasificación de los genes ciclina de *P. vulgaris***

Con el fin de determinar la relación filogenética y la clasificación de las ciclinas de *P. vulgaris*, se obtuvo un árbol filogenético mediante el método *Neighbor Joining*. El árbol filogenético se construyó a partir de las secuencias de aminoácidos de 100 proteínas, 51 ciclinas de *P. vulgaris* y 49 ciclinas de Arabidopsis. Las ciclinas de *P. vulgaris* fueron nombradas de acuerdo a la relación filogenética determinada por las ramas que comparten con las ciclinas de Arabidopsis. El análisis filogenético mostró que las ciclinas de poroto y Arabidopsis se agrupan en 10 tipos: A-, B-, C-, D-, H-, L-, P-, T-, SDS (Solo Dancers) y J18 (Figura 15). La familia de ciclinas de tipo P está representada por 7 miembros en poroto y por 7 miembros en Arabidopsis. En *A. thaliana* los miembros pertenecientes a la familia CYCP, también llamadas CYCU, se agrupan en 4 clases dependiendo de sus relaciones evolutivas (Torres Acosta et al., 2004). Los resultados

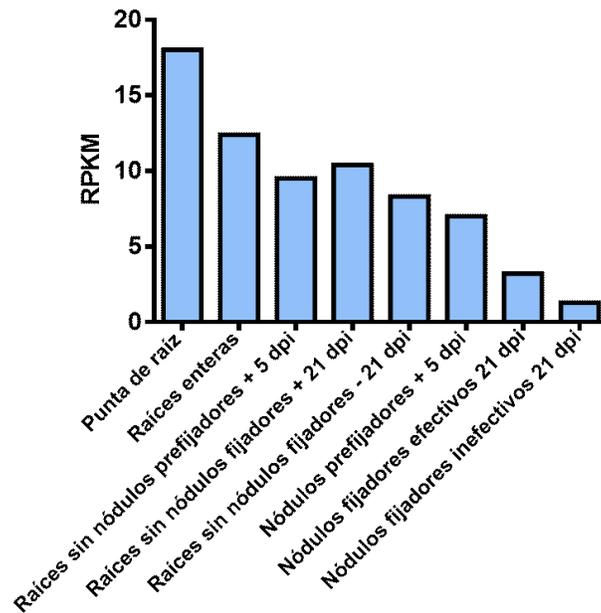
muestran que la proteína PvCYCP pertenece a la clase 4 y que el mejor homólogo en Arabidopsis es AtCYCU4-1 (AT2G44740.1). Basándonos en estos análisis nombramos a la ciclina P usada en el experimento de CHIP-PCR como PvCYCP4-1.



**Figura 15. Análisis filogenético de la familia de ciclinas de *P. vulgaris* y *A. thaliana*.** Árbol filogenético de la familia de ciclinas de *P. vulgaris* y *A. thaliana* realizado en base a la clasificación en familias de Wang (2004). La ciclina de tipo P de *P. vulgaris* (Phvul.008G049600) caracterizada en este trabajo se indica con una flecha. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método de *Neighbor-joining* basado en un análisis de alineamiento múltiple de secuencias. El árbol filogenético fue generado usando MEGA7 a partir de un análisis de Clustal Omega.

## 2. Patrones de expresión de las ciclinas de *P. vulgaris*.

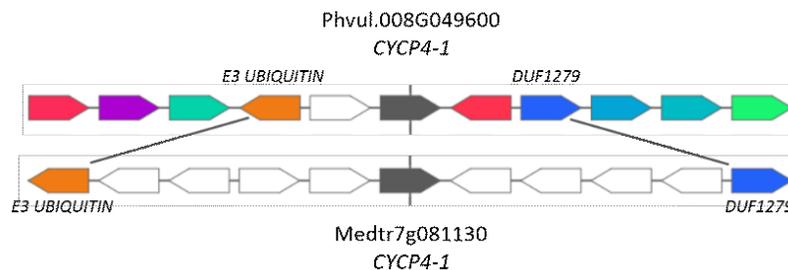
Para conocer el patrón de expresión de PvCYCP4-1 durante la simbiosis fijadora de nitrógeno analizamos los datos de expresión depositados en el atlas de expresión génica de poroto (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>) (O'Rourke et al., 2014). Si bien los resultados muestran expresión tanto en raíces como en nódulos, los valores máximos se observan en punta de raíz y en raíces enteras (Figura 16).



**Figura 16. Perfil de expresión génica de PvCYCP4-1 de *P. vulgaris*.** Niveles de expresión del gen PvCYCP4-1 (Phvul.008G049600) en punta de raíz, raíces enteras, raíces a la cual se le quitaron los primordios de nódulos (sin nódulos prefijadores + de 5 dpi), raíces a la cual se le quitaron los nódulos fijadores efectivos e inefectivos de 21 dpi. También se muestran nódulos fijadores efectivos de 21 dpi (nódulos colonizados por bacterias capaces de fijar nitrógeno de 21 dpi) y nódulos fijadores inefectivos de 21 dpi (nódulos colonizados por bacterias incapaces de fijar nitrógeno de 21 dpi). Los datos fueron obtenidos a partir de datos de RNA-seq basado en el atlas de expresión génica de poroto (O'Rourke et al., 2014). Los valores están expresados en lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (RPKM: Reads Per Kilobase Million) para diferentes tejidos de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.

Además, decidimos analizar datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) de las diferentes zonas del nódulo de 15 dpi del mejor ortólogo de la ciclina *PvCYCP4-1* en *M. truncatula* (Medtr7g081130) (Roux et al., 2014) y datos de expresión de raíz del mejor homólogo en *Arabidopsis* (Brady et al., 2007) extraídos de la base pública The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR), <http://bar.utoronto.ca>.

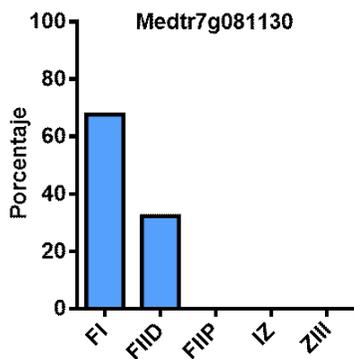
Para inferir cual sería el ortólogo de *PvCYCP4-1* en *M. truncatula* se realizó un análisis de sintenia utilizando el sitio Phytozome V.13 (Figura 17). Se observó que Phvul.008G049600 tiene dos genes flanqueantes en común con Medtr7g081130, por lo que podemos concluir que dicho gen es el ortólogo de *PvCYCP4-1* en *M. truncatula*.



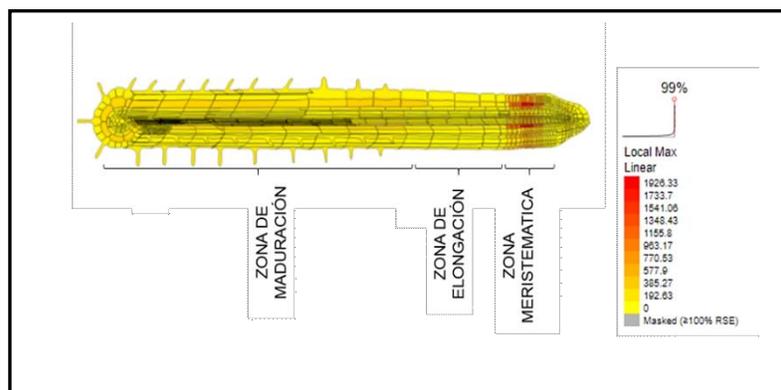
**Figura 17. Análisis de sintenia del gen *CYCP4-1*.** Regiones sinténicas de *CYCP4-1* en *P. vulgaris* (Phvul.008G049600) y en *M. truncatula* (Medtr7g081130). Los genes ancla que flanquean *CYCP4-1* están conectados con líneas de color gris. Datos extraídos de Phytozome v13. Los diferentes tipos de genes se indican con flechas y aquellos que pertenecen a la misma familia se muestran con el mismo color.

El análisis *in silico* del nivel de expresión del gen que codifica la ciclina P de las diferentes zonas del nódulo de 15 dpi (Figura 18) obtenidas por microdissección láser (Roux et al., 2014) reveló un enriquecimiento del transcrito Medtr7g081130, en la zona meristemática del nódulo y en menor medida en la zona de infección distal. Por otra parte, los datos de expresión en *Arabidopsis* (Brady et al., 2007) muestran que el mejor

homólogo de *PvCYCP4-1*, AT2G44740, se expresa principalmente en la zona meristemática de la raíz principal (Figura 19). Estos resultados muestran que la expresión de los genes *CYC4* ocurre principalmente en los meristemas, donde el ciclo celular permanece activo para producir nuevas células.

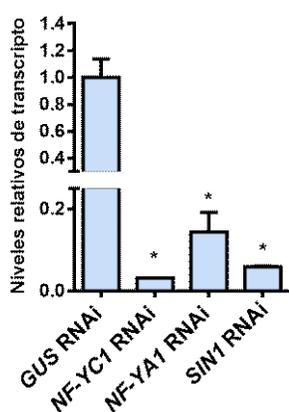


**Figura 18.** Niveles de acumulación del ortólogo de la ciclina *PvCYCP4-1* en *M. truncatula* en las diferentes zonas de nódulo de 15 días obtenidas por microdissección láser. Los datos representan el porcentaje de enriquecimiento de los niveles de los transcritos en las diferentes zonas del nódulo. FI: región apical correspondiente a la zona meristemática; FIId: zona de diferenciación; FIIP: zona de infección; IZ: interzona y ZIII: zona de fijación de nitrógeno. Los datos fueron obtenidos mediante RNA-seq (Roux et al, 2014).



**Figura 19.** *CYCP4-1* se expresa principalmente en la zona meristemática de raíces de *A. thaliana*. Patrón de expresión del ortólogo de *PvCYCP4-1* en raíces de *A. thaliana* (AT2G44740) obtenido a partir de la herramienta bioinformática BAR (<http://bar.utoronto.ca>). Los colores rojo y amarillo denotan niveles de expresión altos y bajos, respectivamente.

Considerando los resultados de CHIP-PCR, que sugirieron que el factor PvNF-YC1 se une directamente a la región promotora *PvCYCP4-1* modulando su expresión y que NF-YC1 forma un heterotrímero con *NF-YA1* y *SIN1*, decidimos determinar los niveles de expresión de *PvCYCP4-1* en raíces *NF-YC1* RNAi, *NF-YA1* RNAi, y *SIN1* RNAi (Figura 20). Observamos que la acumulación de mRNAs de *PvCYCP4-1* se redujo como consecuencia del silenciamiento postranscripcional de *NF-YC1*, *NF-YA1* y *SIN1* comparado con raíces *GUS* RNAi, sugiriendo que estos factores de transcripción también podrían estar modulando la expresión de *PvCYCP4-1*.

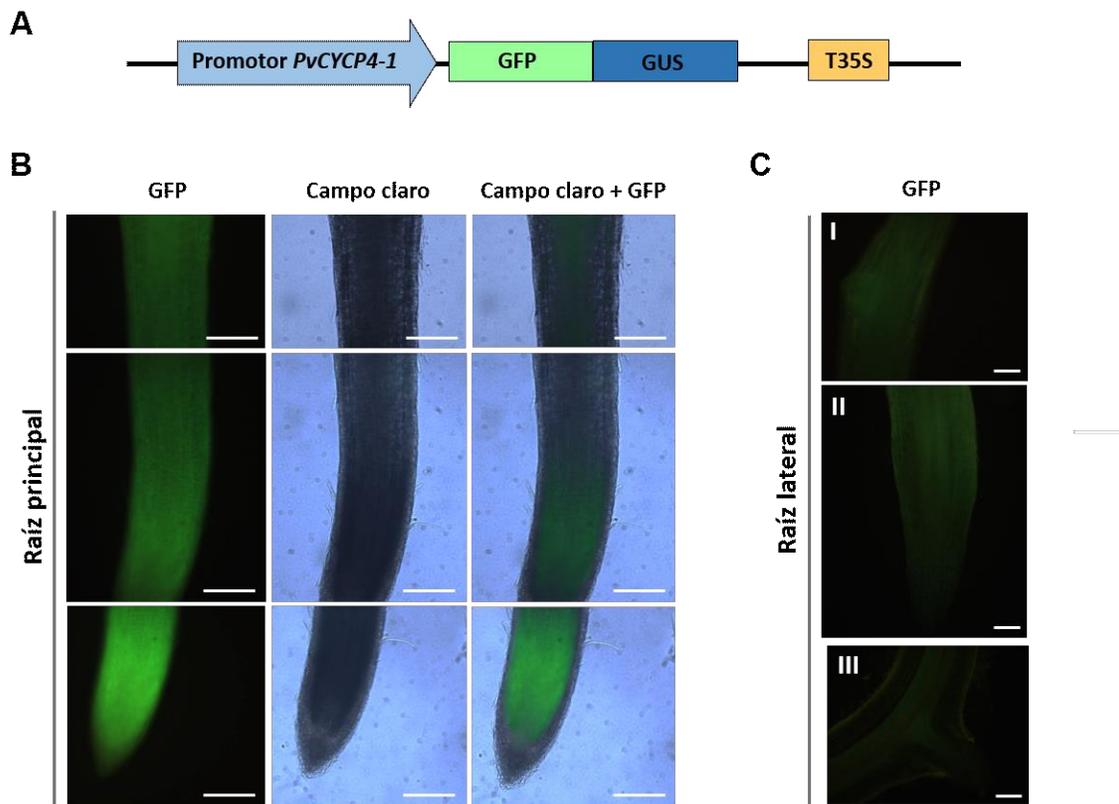


**Figura 20. Niveles de expresión de *PvCYCP4-1* en raíces *NF-YC1* RNAi, *NF-YA1* RNAi, y *SIN1* RNAi.** Niveles de acumulación de los transcritos de *PvCYCP4-1* cuantificados mediante RT-qPCR en el cultivar NAG12 de poroto frente a la inoculación con YEM (control). Los resultados son la media de tres repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican que los valores de las muestras de nódulos son significativamente diferentes de las muestras de raíz en un *test t-Student* no apareado de dos colas con  $p < 0,05$  (\*).

### 3. Análisis de la expresión espacio-temporal del gen *PvCYCP4-1* durante la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno en raíces y nódulos de *P. vulgaris*

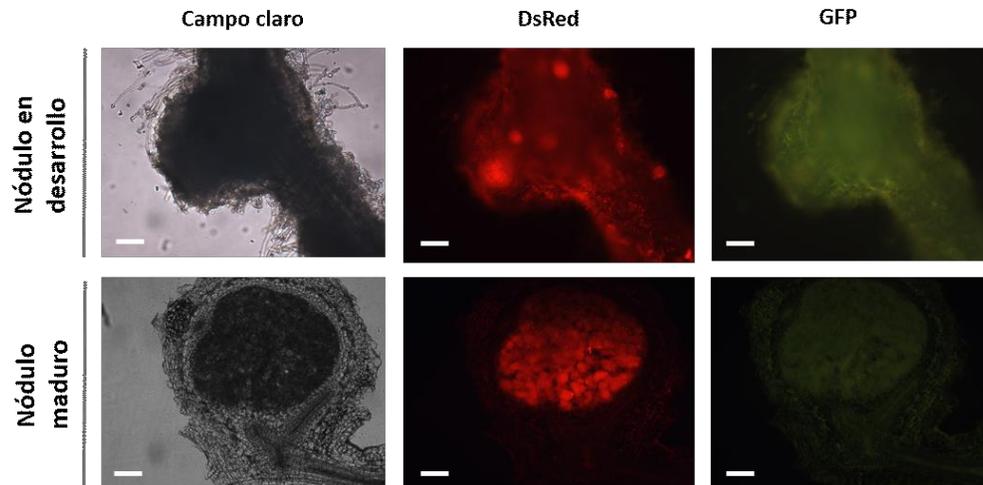
Los resultados de expresión de las ciclinas tipo P revelaron que los ortólogos de *PvCYCP4-1* se acumulan en la zona meristemática de nódulos y raíces de *M. truncatula* y *A. thaliana*,

respectivamente. Con el objetivo de caracterizar el patrón de expresión espacio-temporal de *PvCYCP4-1* en raíces de *P. vulgaris* y en nódulos formados durante la relación simbiótica con *R. etli*, se realizó una fusión transcripcional del promotor de *PvCYCP4-1* a los genes reporteros *gfp* (que codifica la proteína verde fluorescente) y *uidA* (también denominado gen *gus* dado que codifica la proteína  $\beta$ -glucuronidasa, GUS). Para ello se amplificó mediante PCR una región genómica de aproximadamente 2000 nts aguas arriba del codón de inicio de la traducción del gen *PvCYCP4-1*, utilizando como molde DNA genómico (gDNA) de *P. vulgaris*. Posteriormente, el fragmento del promotor se clonó, mediante la tecnología *Gateway* (Invitrogen), en el vector binario pKGWFS7,0 (Karimi et al., 2002) (Figura 21A). Luego, esta construcción fue introducida en raíces de *P. vulgaris* mediante *A. rhizogenes* (Estrada-Navarrete et al., 2006). Este sistema de transformación permite generar plantas compuestas con la parte aérea salvaje y las raíces transgénicas. En las raíces *pCYCP4-1* se observó la expresión de *gfp* en el meristema de las raíces principales (Figura 21B), pero no así en las raíces laterales (Figura 21C).



**Figura 21. El gen *PvCYCP4-1* se expresa en los meristemos de la raíz principal.** **A.** Representación esquemática de la construcción *pCYCP4-1:GFP-GUS*. T35S: terminador del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor. **B.** Expresión del gen reportero *gfp* en los meristemos apicales de las raíces principales de *P. vulgaris* transformadas con la construcción *pCYCP4-1:GFP-GUS*. En la figura se muestran imágenes representativas de microscopía correspondientes a la señal de GFP en los paneles izquierdos, al campo claro en los paneles del medio y la superposición de ambas imágenes en los paneles derechos (merged). **C.** Expresión de *gfp* en los primordios de las RLs, el verde que se observa corresponde a auto fluorescencia emitida por los tejidos de la raíz. Barras: 100  $\mu$ m

Con el fin de analizar la expresión de *PvCYCP4-1* durante la interacción de *P. vulgaris* con *R. etli* se inocularon las raíces transgénicas con una cepa de *R. etli* CFN5X que expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente roja DsRED. No se visualizó expresión de *gfp* en los nódulos en desarrollo ni en los nódulos maduros (Figura 22).



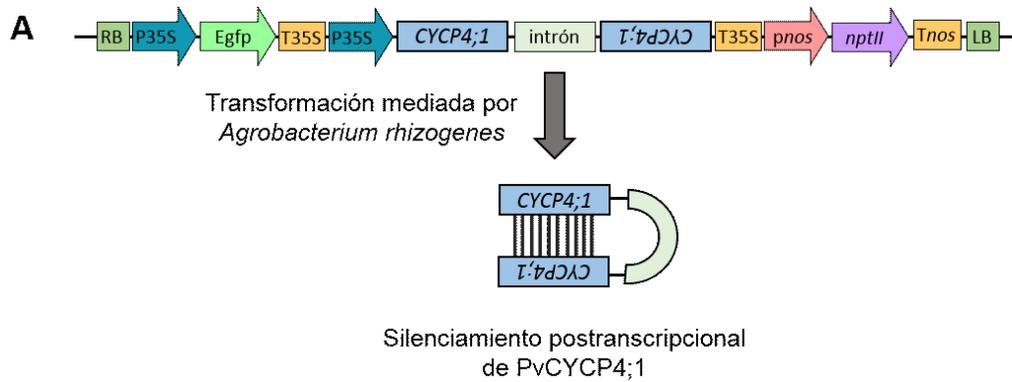
**Figura 22. El gen *PvCYCP4-1* no se expresa en nódulos formados en la interacción simbiótica *P. vulgaris-R. etli*.** Fluorescencia de la proteína GFP en nódulos de *pCYCP4-1:GUS-GFP* a los 6 y 21 dpi con una cepa de *R. etli* que expresa la proteína DsRed. En la figura se muestran imágenes representativas de microscopía correspondientes al campo claro en los paneles izquierdos, a la señal de DsRed en del medio y a la señal de GFP en los paneles derechos, el color verde observado corresponde a auto fluorescencia. Barras: 200  $\mu$ m.

Los resultados observados están en concordancia con los obtenidos en los perfiles de expresión de *PvCYCP4-1* (Figuras 16 y 19), los cuales muestran una fuerte expresión de este gen en el meristema de raíces principales, en punta de raíz y en raíces enteras. Sin embargo, no se observó actividad del promotor en las muestras de nódulos analizadas. Este resultado puede deberse a que este gen podría expresarse en etapas más tempranas, promoviendo las primeras divisiones celulares corticales que conducen a la formación del primordio de nódulo y luego su expresión disminuiría cuando el nódulo crece por expansión celular. Para testear esta posibilidad debería observarse la expresión de *pCYCP4-1* a tiempos más tempranos, cuando se producen las primeras divisiones celulares en el córtex.

## **4. Caracterización funcional de *PvCYCP4-1***

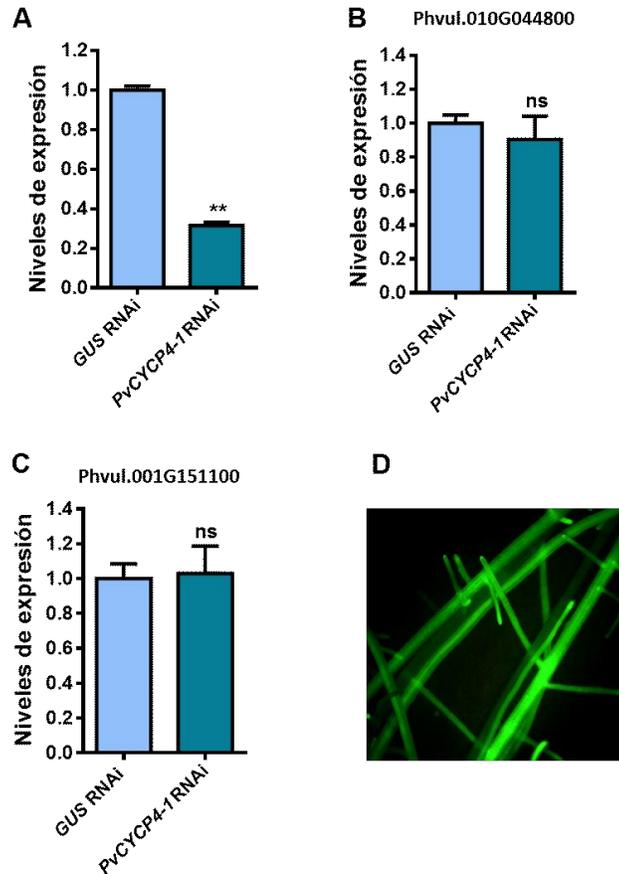
### **4.1. Silenciamiento génico postranscripcional de *PvCYCP4-1***

Los patrones de expresión de *CYCP4-1* descritos anteriormente en *M. truncatula* y en *P. vulgaris* sugieren que esta ciclina podría desempeñar un rol en la simbiosis fijadora de nitrógeno y en la arquitectura de raíz. Por lo tanto, para determinar la función biológica de *PvCYCP4-1* en la nodulación se realizó el silenciamiento postranscripcional mediado por RNA de interferencia (RNAi) de *CYCP4-1* en raíces de *P. vulgaris*. Para generar la construcción *PvCYCP* RNAi se utilizó un fragmento de DNA de 242 pb que corresponde a parte de la región codificante y a parte del extremo 3' UTR del transcripto de *PvCYCP4-1*. Este fragmento fue clonado como repeticiones invertidas en el vector pK7GWIWG2D(II),0, bajo el control del promotor p35S. El vector elegido expresa la proteína fluorescente verde GFP bajo el promotor p35S, lo cual permite seleccionar las raíces transgénicas para análisis fenotípicos mediante la observación bajo luz UV (Figura 23). Para la construcción control se utilizaron secuencias del gen *GUS* como repeticiones invertidas en lugar de *PvCYCP4-1*.



**Figura 23. Silenciamiento génico postranscripcional de *PvCYCP4-1*.** Esquema de la región del T-DNA del vector de destino *pK7GWIWG2D(II)* conteniendo dos copias del fragmento *PvCYCP4-1* clonado en orientaciones opuestas, interrumpidas por un intrón. RB y LB representan los bordes derecho e izquierdo del T-DNA. La expresión del gen *Egfp*, que codifica la proteína fluorescente verde GFP, permite la selección de las raíces transgénicas. El gen *nptII* codifica la neomicina transferasa, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. La expresión del RNAi y el gen *Egfp* están bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (p35S) y el terminador T35S. El gen *nptII* está regulado por el promotor *nos* (*pnos*) y el terminador *Tnos*.

Para verificar la efectividad del silenciamiento producido por la expresión de *PvCYCP4-1* RNAi se determinaron los niveles de mRNA de *PvCYCP4-1* en raíces transformadas con *GUS* RNAi y se compararon con raíces *PvCYCP4-1* RNAi. Las raíces que expresan el RNAi para *PvCYCP4-1* mostraron una reducción del 70 % en niveles de transcritos *PvCYCP4-1* comparado con las plantas control, que expresan la construcción *GUS* RNAi (Figura 24A). A su vez, para determinar si el silenciamiento fue específico de gen, se diseñaron *primers* para otros miembros de la familia de ciclinas P.

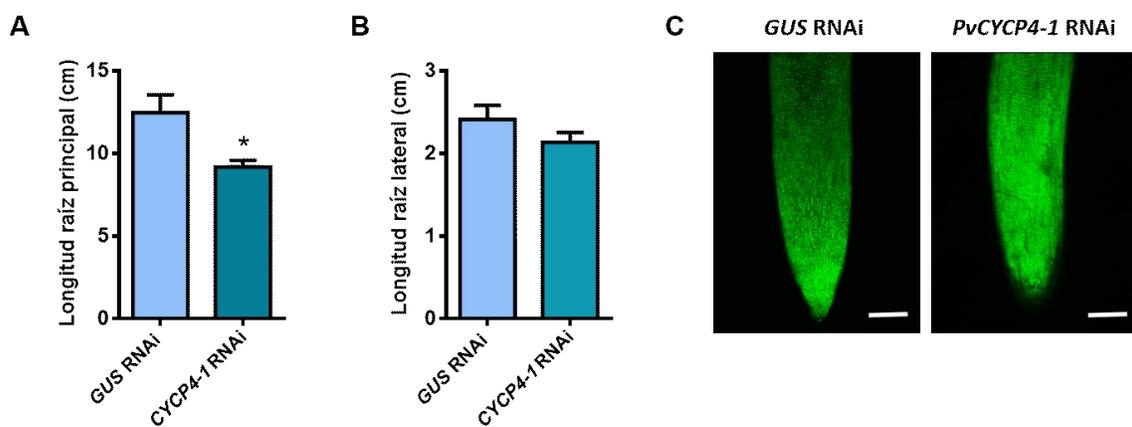


**Figura 24. Silenciamiento postranscripcional de *PvCYCP4-1* por RNAi.** Niveles de expresión relativa de *PvCYCP4-1* (A) y sus homólogos más cercanos, Phvul.010G044800 (B) y Phvul.001G151100 (C) en raíces transformadas con *PvCYCP4-1* RNAi o *GUS* RNAi como control. Los resultados son la media de tres repeticiones técnicas y las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un t-test con  $p < 0,01$  (\*\*). Los datos fueron normalizados respecto a los valores de expresión de *EF1 $\alpha$*  y expresados en relación al valor de *GUS* RNAi. D. Raíces transgénicas de *P. vulgaris* *PvCYCP4-1* RNAi observadas en la lupa de fluorescencia con filtro para GFP.

A partir del árbol filogenético mostrado en la Figura 15 se seleccionaron los genes, Phvul.010G044800 y Phvul.001G151100. El análisis de expresión por RT-qPCR mostró que los niveles de estos genes no se vieron alterados por la estrategia de silenciamiento (Figuras 24B y 24C), permitiendo concluir que la construcción RNAi diseñada silenció de forma efectiva y específica a *PvCYCP4-1*.

#### 4.2. Efecto del silenciamiento de *PvCYCP4-1* en la arquitectura de la raíz

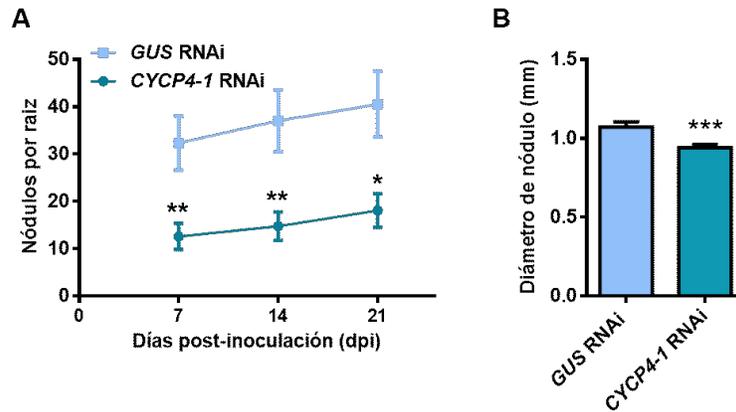
Teniendo en cuenta la expresión de *PvCYCP4-1* en la región meristemática de la raíz, se decidió evaluar la arquitectura de la raíz en plantas con niveles alterados de *PvCYCP4-1*. Se cuantificó la longitud de las raíces principales y las raíces laterales en plantas *PvCYCP4-1* RNAi y *GUS* RNAi como control. Además se observó la zona apical de la raíz principal mediante microscopía confocal. La reducción de los niveles de *PvCYCP4-1* afectó el crecimiento y el desarrollo de la raíz principal (Figura 25A); la longitud promedio de las raíces principales en las plantas *PvCYCP4-1* RNAi fue significativamente menor que aquella de las plantas *GUS* RNAi. Por otro lado, no se observaron variaciones significativas en la longitud de las raíces laterales (Figura 25B). La organización celular de la zona apical de las raíces principales fue similar en plantas compuestas *GUS* RNAi y *PvCYCP4-1* RNAi a partir de la comparación visual de diferentes planos observados en diferentes raíces mediante microscopía confocal (Figura 25C). Estos resultados sugieren que *PvCYCP4-1*, estaría involucrada en la regulación del crecimiento de las raíces principales.



**Figura 25. Efecto del silenciamiento de *PvCYCP4-1* en el desarrollo radical.** La longitud de la raíz principal (A), y la longitud de la raíz lateral (B) fueron medidas en raíces *GUS* y *PvCYCP4-1* RNAi. El asterisco en A indica una diferencia significativa en un t-test de Student con  $p < 0,05$ . Las barras de error representan el SEM. Se muestran experimentos representativos de dos experimentos independientes. C. Organización general de las células de la punta de la raíz de plantas compuestas *GUS* o *PvCYCP4-1* RNAi. Las raíces fueron observadas en un microscopio confocal de fluorescencia con ajustes óptimos para GFP. Las imágenes fueron obtenidas por la integración en z de secciones de 5  $\mu\text{m}$ . Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. *PvCYCP4-1* es requerido para la organogénesis del nódulo

Con el objetivo de estudiar la función de *PvCYCP4-1* en el contexto de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno, se analizó el fenotipo asociado a la nodulación en las raíces de *P. vulgaris* con niveles disminuidos de *PvCYCP4-1*. Para ello, se inocularon con *R. etli* plantas transformadas con las construcciones *PvCYCP4-1* RNAi o con la construcción *GUS* RNAi y se evaluó el número de nódulos por raíz a los 7, 14 y 21 días post infección (dpi). Las cinéticas de nodulación mostraron que las raíces *PvCYCP4-1* RNAi forman una menor cantidad de nódulos respecto a las raíces control a todos los tiempos observados. A 21 dpi se cuantificó el tamaño de los nódulos formados con el fin de determinar si el silenciamiento de *PvCYCP4-1* afecta su desarrollo. Los nódulos formados a este tiempo mostraron una reducción significativa de su tamaño respecto al control (Figura 26). Estos resultados sugieren que *PvCYCP4-1* es requerido para la organogénesis y desarrollo del nódulo.

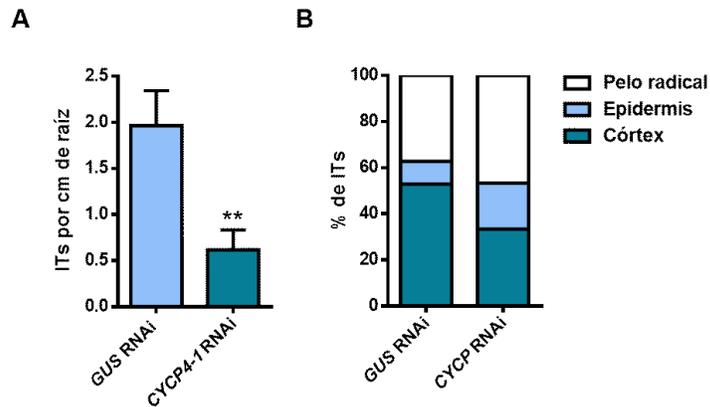


**Figura 26. El silenciamiento de CYCP4-1 afecta el número y tamaño de los nódulos.** **A.** Plantas de *P. vulgaris* transformadas con *PvCYCP4-1* RNAi o *GUS* RNAi fueron crecidas durante 7 días en ausencia de nitratos y luego fueron inoculadas con un cultivo de *R. etli* SC15. El número de nódulos por raíz fue cuantificado a 7, 14 y 21 dpi ( $n > 10$  para cada condición). **B.** A 21 dpi los nódulos fueron fotografiados y se les midió el diámetro mediante el software Photoshop ( $n > 50$  para cada condición). En **A** y **B** las barras de error representan el SEM y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control en un *t*-Student con  $p < 0,05$  (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Se muestran experimentos representativos de tres experimentos independientes.

#### 4.4. *PvCYCP4-1* es requerido para la infección por rizobios

La disponibilidad de cepas de rizobios que expresan marcadores fluorescentes nos permitió evaluar mediante microscopía de fluorescencia el número de ITs formados, así como también su progresión hacia las células corticales. Se cuantificó la formación de ITs a los 7 dpi utilizando la cepa CFNX5 de *R. etli* que expresa la proteína fluorescente DsRed. El silenciamiento de *PvCYCP4-1* en raíces de *P. vulgaris* produjo una importante reducción en la densidad de los hilos de infección en comparación con las raíces control transformadas con *GUS* RNAi (Figura 27A). Paralelamente, los ITs fueron clasificados considerando su progreso en la infección: detenidos en el pelo radical, la epidermis, o que hubieran progresado hasta el córtex. La cuantificación de la progresión de los ITs no mostró diferencias entre las plantas *PvCYCP4-1* o *GUS* RNAi (Figura 27B). Estos resultados sugieren

que *PvCYCP4-1* sería requerido para la iniciación de los eventos de infección rizobiana, pero no para su progresión hacia el primordio del nódulo.



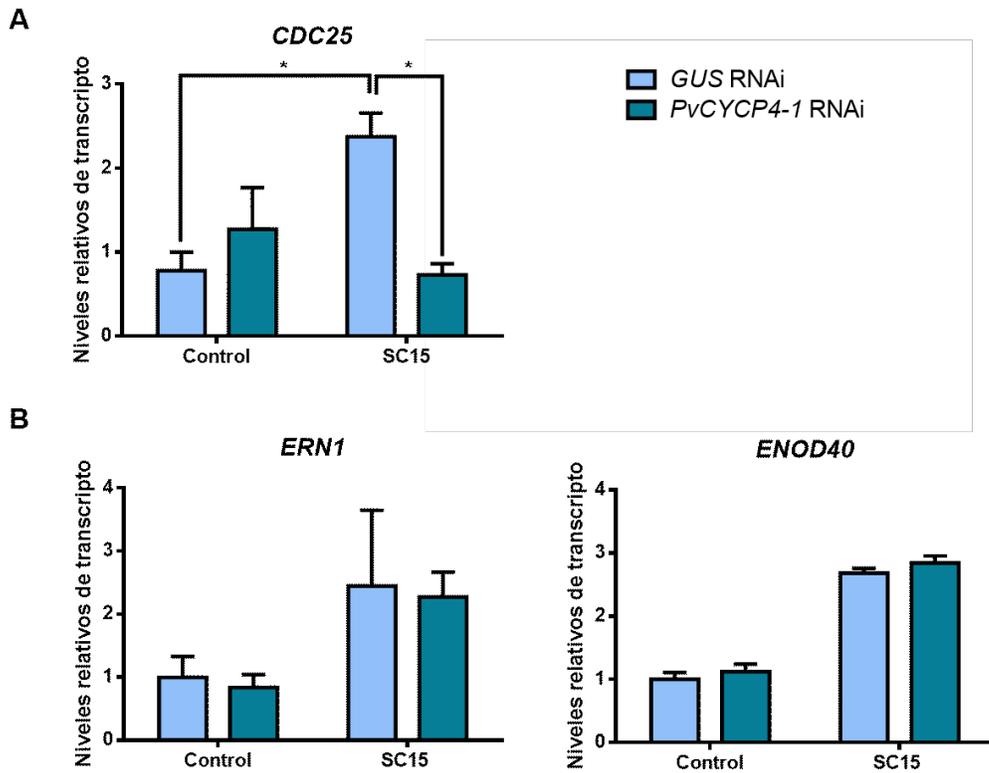
**Figura 27. Efecto del silenciamiento de *PvCYCP4-1* sobre los eventos de infección rizobiana.** **A.** Cuantificación de ITs por centímetro de raíz en las raíces *PvCYCP4-1* RNAi o *GUS* RNAi a 7 los dpi con una cepa *R. etli* que expresa la proteína DsRed mediante microscop de fluorescencia. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican que los valores de *PvCYCP4-1* RNAi son significativamente diferentes de los *GUS* RNAi en un *test t-Student* con  $p < 0,01$  (\*\*). **B.** Porcentaje de eventos de infección que se encuentran detenidos en el pelo radical, que alcanzaron la epidermis o el córtex en las raíces *PvCYCP4-1* RNAi o *GUS* RNAi a los 7 dpi. Los datos en A y B son representativos de tres réplicas biológicas independientes, con más de 30 raíces por cada condición y ensayo.

## 5. Impacto del silenciamiento de *PvCYCP4-1* sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular

Los factores de transcripción NF-Y regulan la expresión de genes involucrados en el control de la progresión del ciclo celular en mamíferos, tales como los genes *CDC2*, *CDC25* y *ciclina B*, implicados en la transición G2/M (Caretti et al., 2003). En plantas, se ha demostrado que NF-YC1, NF-YA1 y NF-YA9 controlan directa o indirectamente la expresión de algunos de estos genes del ciclo celular durante la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* y *R. etli* (Zanetti et al., 2010, Rípodas et al., 2019). Por lo tanto, decidimos evaluar si el silenciamiento de *PvCYCP4-1*, cuyo promotor se observó previamente que

interacciona con PvNF-YC1, afecta la expresión del gen *CDC25* del ciclo celular. Como se observa en la figura 28A, el silenciamiento de *PvCYCP4-1* produjo una reducción significativa de los niveles de *CDC25* en las raíces *PvCYCP4-1* RNAi inoculadas con *R. etli* o con medio YEM como control (barras negras) en comparación con las raíces *GUS* RNAi (barras blancas), sugiriendo que *PvCYCP4-1* podría participar de la activación de este gen del ciclo celular implicado en los primeras etapas de la formación del nódulo. *PvCYCP4-1* podría participar de la organogénesis del nódulo promoviendo la activación de las primeras divisiones celulares corticales que conducen a la formación del primordio de nódulo.

Para obtener información sobre los eventos moleculares afectados por el silenciamiento de *PvCYCP4-1*, se analizó la expresión de dos genes marcadores de la nodulación temprana, *ENOD40* y *ERN1*, que incrementan sus niveles de mRNA en *P. vulgaris* frente la inoculación con rizobios (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010). Los experimentos de RT-qPCR revelaron que los patrones de expresión de *ENOD40* y *ERN1* no fueron afectados de forma significativa por el RNAi de *PvCYCP4-1*, indicando que *PvCYCP4-1* podría estar actuando independientemente de estos genes de nodulación temprana (Figura 28B).



**Figura 28. Efecto del silenciamiento de *PvCYCP4-1* sobre la expresión de nodulinas tempranas y el gen *CDC25* del ciclo celular.** Raíces que expresan *GUS* o *PvCYCP4-1* RNAi fueron inoculados con la cepa *R. etli* SC15 o con medio YEM como control. El tejido fue colectado a las 24 hpi. La expresión de los genes indicados se determinó mediante RT-qPCR. Los niveles de los transcritos fueron normalizados por los niveles del transcripto *PvEF1 $\alpha$* , y expresados en relación a los valores de las raíces control de *GUS* RNAi. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de dos réplicas biológicas independientes. Las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican que los valores de expresión en *PvCYCP4-1* RNAi son significativamente diferentes de los de raíces *GUS* RNAi en un *test t-Student* no apareado de dos colas con ( $p < 0,05$  \*).

## DISCUSIÓN

En contraste con los animales, el desarrollo de las plantas es en gran parte postembrionario y es llevado a cabo por células madres en las regiones apicales de tallos y raíces, llamadas meristemas apicales (Inzé et al., 2006). Además, las células vegetales diferenciadas tienen la capacidad de dediferenciarse y adquirir pluripotencialidad como resultado del control del desarrollo o en respuesta a señales específicas de la planta, como las fitohormonas, o factores externos como la luz, heridas, patógenos o interacciones simbióticas (Grafi et al., 2004). Las leguminosas pueden desarrollar en sus raíces dos tipos de órganos postembrionarios: las raíces laterales y los nódulos fijadores de nitrógeno. La formación del nódulo implica la reactivación de la división celular en células ya diferenciadas, tales como las corticales y las que forman parte del periciclo y la endodermis (Xiao et al., 2014). Los nódulos de tipo indeterminado establecen durante su desarrollo un meristema que será persistente y permitirá el crecimiento indefinido para dar un nódulo cilíndrico (Gage, 2004), mientras que los nódulos determinados establecen un meristema transitorio y luego crecen por expansión celular, dando origen a un nódulo esférico (Rolfe, et al., 1988). En ambos casos, la activación de genes reguladores del ciclo celular, especialmente aquellos relacionados con la transición G2/M, son activados en los tejidos internos de la raíz en el lugar donde se produce la infección rizobiana. Estudios previos han mostrado el rol del factor de transcripción heterotrimérico NF-Y en la reactivación de la división celular, tanto en sistemas animales como vegetales (Carette et al., 2003, Savouré et al., 1994; Yang et al., 1994). Nuestro laboratorio mostró la función de los factores de transcripción NF-YC1 y NF-YA1 en la activación de genes tales como *CDC2*,

*CDC25* y *CYCB* durante las primeras etapas de formación del primordio del nódulo (Zanetti et al, 2010). La interacción entre NF-YC1 y elementos presentes en el promotor de la ciclina *PvCYCP4-1* aporta evidencia a que la regulación de genes del ciclo celular por parte del complejo NF-Y ocurre en forma directa. Ensayos de genética funcional mostraron que esta ciclina es requerida para la correcta formación del nódulo, ya que la reducción de sus niveles mediante RNAi produjo una fuerte disminución de los nódulos formados a lo largo del tiempo, así como su morfología, ya que los nódulos provenientes de raíces *PvCYCP4-1* RNAi mostraron un menor desarrollo. Los eventos de infección también mostraron una diferencia significativa con las plantas control *GUS* RNAi, sugiriendo que la falta de divisiones celulares en el córtex podría interferir con la formación y progresión de los hilos de infección. El requerimiento de divisiones celulares corticales iniciales para la progresión de los IT fue propuesto previamente para el desarrollo de nódulos indeterminados de *M. truncatula* (Gonzalez-Rizzo et al., 2006). Teniendo en cuenta que la infección y la organogénesis del nódulo constituyen programas genéticos separados, este efecto podría deberse a una falla en la coordinación que ocurre a través del intercambio de señales entre la epidermis y el córtex. Por otra parte, los complejos ciclina-CDK participan en la fosforilación de componentes celulares más allá de la regulación directa del ciclo celular, como por ejemplo elementos que regulan la dinámica del citoesqueleto (Bendris et al., 2015). Teniendo en cuenta que la formación del IT requiere rearrreglos de los filamentos de actina y los microtúbulos, es posible una acción directa de la ciclina sobre estos componentes mediante la fosforilación.

El silenciamiento de *PvCYCP4-1* produjo una reducción del nivel de los transcritos del gen *CDC25* implicado en las primeras etapas de la formación del nódulo. Este efecto podría estar mediado por la actividad de la CDK modulada por *PvCYCP4-1* o ser un efecto indirecto de la acción de esta ciclina sobre la reactivación de las divisiones celulares.

En conjunto, nuestros resultados muestran que *PvCYCP4-1* estaría regulando las divisiones celulares corticales que dan origen al nódulo a partir de la regulación directa del complejo NF-Y. Los ensayos de expresión mostraron que el promotor de *PvCYCP4-1* es activo en la zona meristemática de la raíz. Este resultado es compatible con lo observado para el mejor homólogo de *A. thaliana*. A su vez, este patrón de expresión es coherente con lo observado en los ensayos funcionales, ya que se observó que la disminución de los niveles de *PvCYCP4-1* afecta también el crecimiento de la raíz principal, pero no de las raíces laterales. La función de la ciclina en la nodulación inferida a partir de la caracterización funcional del gen sugiere que participaría en la organogénesis del nódulo. Sin embargo, no se observó fluorescencia en nódulos de 6 y 21 días, indicando que a los tiempos seleccionados el promotor ya no estaría activo. Como se mencionó en la sección de resultados, sería necesario repetir el ensayo de actividad del promotor a etapas anteriores a que ocurran las primeras divisiones celulares (24 hpi) hasta la formación del primordio del nódulo (96 hpi aproximadamente), cuando el tejido crece a partir de las divisiones celulares y no por expansión celular (Patriarca et al., 2004, Kouchi et al., 2004).

La expresión de *PvCYCP4-1* se ve disminuida en raíces que tienen niveles reducidos de *NFYC1* y *NF-YA1*, tal cual es esperable en función de los resultados de inmunoprecipitación de cromatina. Un resultado similar se obtuvo en plantas que expresan un RNAi dirigido

contra *SIN1*, sugiriendo que este factor de transcripción también estaría involucrado en la activación de esta ciclina en el contexto de la nodulación. Teniendo en cuenta que *SIN1* fue identificado como un factor de transcripción de tipo GRAS capaz de interactuar físicamente con NF-YC1 (Battaglia et al., 2014), es posible que este factor forme parte del complejo transcripcional que se une al promotor de *PvCYCP4-1*. Esta hipótesis podría ser contrastada a través de ensayos de ChIP utilizando plantas transformadas con *SIN1-FLAG*. Los ensayos de ChIP también mostraron que NF-YC1 interacciona con la región promotora de *ERN1*, y no así con el promotor de *ERN2*. Este resultado se correlaciona con los datos de expresión obtenidos por transcriptómica, que muestran que mientras los niveles de *ERN1* aumentan en respuesta a la inoculación con rizobio, los niveles de *ERN2* permanecen constantes. Si bien el resultado obtenido con *ERN1* corrobora lo observado en *M. truncatula*, la conservación de la interacción en otra especie leguminosa sugiere que esta regulación estaría evolutivamente conservada, y por otra parte aporta un control positivo para ser usado en futuros experimentos de ChIP en *P. vulgaris*.

En conclusión, el análisis funcional de la ciclina *PvCYCP4-1* sugiere que la misma podría ejercer un rol en la activación de las divisiones celulares corticales requeridas para el desarrollo del nódulo y la infección rizobiana. Estos resultados permiten ampliar el conocimiento sobre la vía de transducción de señales que involucra al complejo NF-Y.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Material biológico

### 1.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* cultivar NAG12 (Mesoamericano) obtenidas del INTA, Estación Experimental Agropecuaria Salta, Cerrillos, Argentina.

### 1.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

#### Cepas de *Escherichia. coli*

Cepa	Aplicación	Referencia
Dh5 $\alpha$	Cepa utilizada para el mantenimiento y multiplicación de plásmidos	(Taylor et al., 1993)
TOP10	Cepa de alta eficiencia de transformación provista por Invitrogen para realizar transformaciones de las reacciones de pENTR y LR clonasa	Invitrogen

Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y TOP10 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.

#### Cepas de *Rhizobium etli* y *Agrobacterium rhizogenes*

Especie	Cepa	Referencia
<i>R. etli</i>	55N1 (Polimorfismo <i>nodC</i> - $\delta$ )	(Aguilar et al., 2004)
<i>R. etli</i>	SC15 (Polimorfismo <i>nodC</i> - $\alpha$ )	(Aguilar et al., 2004)
<i>R. etli</i>	CFNX5 DsRed (expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente roja). (Polimorfismo <i>nodC</i> - $\alpha$ )	(Rípodas et al., 2013)
<i>A. rhizogenes</i>	K599	(Bond and Gresshoff, 1993)

Las cepas de *R. etli* se cultivaron inicialmente en medio YEM sólido con agregado de Rojo Congo a 28 °C y posteriormente en medio YEM líquido a 28 °C con agitación a 250 rpm.

Las cepas de *A. rhizogenes* fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes a 28 °C y posteriormente en medio LB líquido selectivo a 28 °C con agitación a 250 rpm.

## 2. Medios de cultivo y soluciones

### 2.1. Medio de cultivo para *E. coli* y *A. rhizogenes*

---

<b>LB Luria-Bertani</b>	
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Triptona	10 g/l

---

El medio LB fue suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección de cada cepa. Para el medio LB- sólido se adicionaron 15 g/l de agar.

### 2.2. Medio de cultivo para rizobios

---

<b>YEM (yeast extract mannitol)</b>	
Extracto de levadura	0,4 g/l
Manitol	7 g/l
NaCl	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l

---

Para el medio de cultivo YEM sólido, el medio fue suplementado con 10 ml/l de una solución acuosa de Rojo Congo 2,5 g/l y 15 g/l de agar.

### 2.3. Medio Fahraeus

Solución mineral nutritiva para riego de las plantas de *P. vulgaris*, tanto *in vitro* como en potes. Para el crecimiento en cajas acrílicas se adicionaron 10 g/l de agar bacteriológico (Britania).

Soluciones	Concentración 1000X
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub>	0,78 M
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,49 M
Citrato férrico	0,02 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,74 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,84 M
<b>Micronutrientes</b>	
KCl	50 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25 mM
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5 mM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5 mM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 mM
Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 mM

Los macro y micronutrientes se prepararon como solución stock concentrada 1000 veces. Las soluciones de macronutrientes fueron esterilizadas por autoclave, mientras que los micronutrientes fueron esterilizados a través de un filtro de 0,45 µm de poro. En el caso de los ensayos de crecimiento sin la inoculación con rizobio, las plantas fueron cultivadas en medio Fahraeus suplementado con KNO<sub>3</sub> 0.8 mM.

## 2.4. Medio de preservación de microorganismos

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron luego suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 % (v/v). Se almacenaron en freezer a -80 °C hasta su utilización.

## 2.5. Antibióticos

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

Antibiótico	<i>E. coli</i> (µg/ml)	<i>A. rhizogenes</i> (µg/ml)	<i>R. etli</i> (µg/ml)
Cloranfenicol	50	150	-
Kanamicina	50	200	-
Espectinomicina	-	200	-
Tetraciclina	-	-	5

## 3. Vectores de clonado

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

**pK7GWIWG2D (II):** Vector compatible con el sistema GATEWAY para la generación de un RNA de interferencia (RNAi). El plásmido posee dos sitios de recombinación opuestos para dar lugar a la formación de una repetición invertida del fragmento seleccionado. Posee el gen *Sm/SpR*, que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen *KanR*, bajo el control del promotor *nos* (nopalina sintasa), para su selección en

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

**pKGWFS7, 0:** Vector compatible con el sistema GATEWAY para la fusión transcripcional de promotores al gen reportero que codifica la proteína  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (Karimi et al., 2002). El plásmido posee el gen *Sm/SpR* que confiere resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y el gen *KanR*, bajo el promotor nos (nopalina sintasa), para su selección en plantas.

## **4. Métodos generales de clonado y transformación de DNA plasmídico**

### **4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20  $\mu$ l con la siguiente concentración de reactivos: buffer de reacción 1 X,  $MgSO_4$  1,5 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,25  $\mu$ M, y enzima *Taq Pegasus* 1 U (Productos Bio-Lógicos). Como molde se utilizaron células, plásmidos, gDNA, cDNA o RNA dependiendo del caso. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un ciclador térmico Mastercycler gradient (Eppendorf). El número de ciclos y el tiempo de elongación fueron diferentes en función del tamaño del fragmento a amplificar. El programa estándar consistió en una primera incubación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura de hibridación indicada, 1 min por kb a 72 °C y como paso final, 10 minutos a 72 °C. Se utilizaron 35 ciclos de amplificación excepto en los casos de amplificación semicuantitativa, en los cuales se realizaron 25 ciclos, y en algunos casos de amplificación de promotores, que se utilizaron 40 ciclos de amplificación.

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

#### **4.2. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa**

Los productos de las reacciones de PCR, de las minipreparaciones de plásmido y de las extracciones de RNA fueron analizados en geles de agarosa en un rango de entre 0,8 % y 2 % (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en buffer TBE 0,5 X (Tris base 0,045 M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,045 M, EDTA 0,5 mM, pH 7,2) y se adicionó bromuro de etidio (BrEt) para visualizar las bandas. Para sembrar las muestras en el gel, se les agregó 1/6 volúmenes de *buffer* de siembra 6X (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,5 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5 X a voltaje constante (90 V). Para visualizar los perfiles electroforéticos se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta y las imágenes se capturaron con una cámara digital (UVITEC Cambridge).

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

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial PURO Gel Extraction (PB-L Productos Bio-Lógicos) siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 4.4. Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY

El vector de clonado pENTR/D-TOPO (Invitrogen) permite la incorporación direccional de un fragmento de PCR en un vector compatible con el sistema GATEWAY. El método de clonación se basa en la ligación direccional mediante la enzima topoisomerasa I en uno de los extremos del plásmido. El *primer* forward utilizado para amplificar la secuencia de interés debe contener los nucleótidos CACC adicionales en el extremo 5'. Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados en el vector pENTR/D-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y posteriormente se clonaron en los vectores de destino correspondientes mediante recombinación utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen). El vector de destino posee las secuencias attR1 y attR2 para permitir la recombinación con las secuencias attL1 y attL2 del vector pENTR/D-TOPO.

Para la construcción de las fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los genes *PvCYCP4-1* y *PvIDN2* se amplificaron las secuencias *upstream* de los marcos abiertos de lectura (aproximadamente 2 Kb) de dichos genes mediante PCR utilizando como molde DNA genómico de *P. vulgaris* NAG12. Estas regiones promotoras fueron clonadas en el vector pENTR/D-TOPO y posteriormente subclonado mediante recombinación sitio específica utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen) en el vector de destino pKGWFS7,0, en el cual la secuencia clonada dirige la expresión de los genes reporteros *uidA* y *gfp*, que codifican para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y GFP, respectivamente.

Para el silenciamiento postranscripcional de *PvCYCP4-1* y *PvIDN2* mediante RNAi, se amplificaron por PCR un fragmento de 229 pb correspondiente al extremo C-terminal de la región codificante de *PvCYCP4-1*, un fragmento de 243 pb correspondiente a la región 3'

UTR de *PvIDN2*, utilizando *primers* específicos detallados en la Tabla nro 2 y como molde cDNA de *P. vulgaris* NAG12 24 horas post-inoculación (hpi) con *R. etli* SC15. Los fragmentos obtenidos fueron purificados y clonados en el vector pENTR/D–TOPO y recombinados mediante la enzima LR en el vector de destino pK7GWIWG2D (II), dando lugar a la formación de dos repeticiones invertidas del fragmento correspondiente en el vector de destino. La mezcla de recombinación se utilizó para la transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se aislaron los plásmidos recombinantes y se confirmó la identidad de la construcción por secuenciación.

#### **4.5. Preparación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ y TOP10 electrocompetentes**

Células DH5 $\alpha$  o TOP10 fueron sembradas por estriamiento en medio LB sólido a partir de un glicerol stock. Luego de 24 horas en estufa a 37 °C, se tomó una colonia aislada y se preparó un cultivo de LB líquido que fue incubado durante toda la noche a 37 °C y agitación a 250 rpm. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo bacteriano saturado en LB y se incubó en las condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8. Luego se centrifugó 10 minutos a 6000 *g* a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 ml glicerol 10 % a 4 °C y se repitió el paso de centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 ml de glicerol 10 % a 4 °C. Nuevamente, se centrifugó durante 10 minutos a 6000 *g* a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 4 ml de glicerol 10 % a 4 °C y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500  $\mu$ l de glicerol 10 % a 4 °C. Finalmente, se fraccionó en alícuotas de 40  $\mu$ l, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

#### **4.6. Transformación de células de *E. coli* DH5α y TOP10 electrocompetentes**

Una suspensión de 40 µl de bacterias electrocompetentes se mezcló con 1 µl de plásmido, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación estéril previamente enfriada a -20 °C y se incubó durante 2 minutos en hielo. Posteriormente, las células competentes se transformaron mediante un pulso de electroporación a 2,2 kV, durante 5 milisegundos, con una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200 Ω, utilizando un electroporador Gene Pulser (BioRad). Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB y la suspensión bacteriana se incubó a 37 °C con agitación de 150 rpm durante 1 hora. Finalmente, la suspensión de células fue centrifugada brevemente a 6000 *g* y resuspendida en 100 – 200 µl de medio, que fueron sembrados en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

#### **4.7. Minipreparación de DNA plasmídico**

Las células de *E. coli* transformadas fueron incubadas a 37 °C en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente hasta la saturación del cultivo. A partir de este cultivo se realizó el aislamiento de DNA plasmídico, utilizando el kit comercial Miniprep Puro Plásmido (Productos Bio-Lógicos), siguiendo las instrucciones detalladas por el proveedor.

### **5. Generación de plantas compuestas de *P. vulgaris***

#### **5.1. Preparación de células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 electrocompetentes**

Células de *A. rhizogenes* K599 fueron sembradas por estriamiento en medio LB sólido a partir de un glicerol stock. Luego de 2 días de incubación en estufa a 28 °C, se tomó una colonia aislada y se preparó un cultivo de LB líquido que fue incubado *overnight* a 28 °C y

250 rpm. A partir de este cultivo se realizó una dilución 1/100 en 200 ml de medio LB y se incubó a 28 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 6000 *g* y 4 °C durante 10 minutos. Una vez removido el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 200 ml de glicerol 10 %. Posteriormente, se volvió a centrifugar el homogenato, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 ml de glicerol 10 %. Este último paso se repitió en las mismas condiciones pero el precipitado se resuspendió en 2 ml de glicerol 10 %. Finalmente se fraccionó en alícuotas de 40 µl, se colocaron los tubos rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

## **5.2. Transformación de células de *A. rhizogenes* K599 electrocompetentes**

Las células competentes se transformaron mediante 1 pulso de electroporación de 2,5 kV, durante 5 milisegundos, con una capacitancia de 25µF y una resistencia de 400Ω, utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser (BioRad) y cubetas de electroporación de 2 mm de espesor estériles. En las cubetas se colocaron 40 µl de bacterias competentes previamente mezcladas con 1 µl del plásmido de interés y se procedió a la electroporación. Inmediatamente la suspensión bacteriana fue recuperada de la cubeta, colocada en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de medio LB e incubada durante 1 hora a 28 °C y 250 rpm. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 6000 *g* durante 1 minuto y resuspendido en 100 µl de medio. Finalmente, la suspensión de células fue sembrada en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28 °C durante 24 horas.

### **5.3. Esterilización y germinación de semillas**

Las semillas de *P. vulgaris* de la variedad NAG12 fueron esterilizadas superficialmente con etanol 96 °C durante 30 segundos. Luego se las incubó en una solución de hipoclorito de sodio 10 % (v/v) con agitación suave por 15 minutos. Luego de 6 lavados con agua destilada estéril, las semillas fueron colocadas en cajas de acrílico sobre papel absorbente humedecido con agua, y se incubaron durante 72 horas en cámara de cultivo a 26 °C y en oscuridad para su germinación.

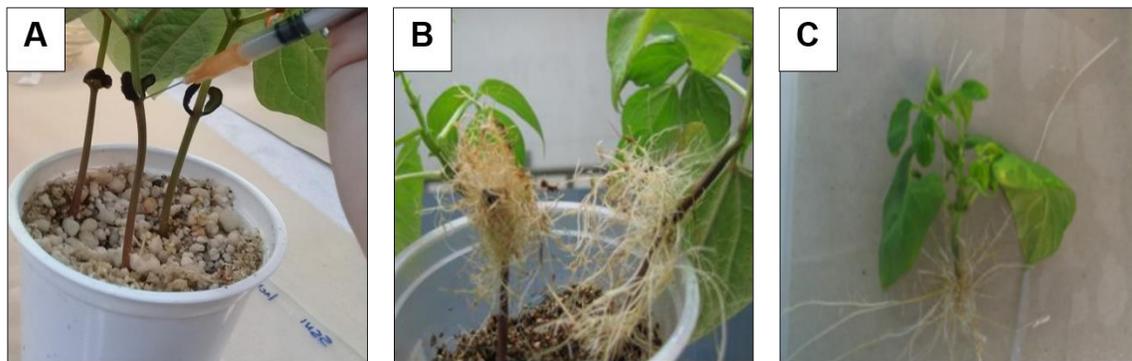
### **5.4. Crecimiento de plántulas**

Las semillas germinadas fueron transferidas a potes plásticos conteniendo una mezcla de arena y perlita (3:1) previamente esterilizadas. Fueron regadas con medio Fahraeus suplementado con KNO<sub>3</sub> 8 mM. Las plántulas fueron incubadas en una cámara de cultivo Percival Intellus Control System I41LLX a 26 °C, 80 % de humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas durante 5 días.

### **5.5. Transformación de raíces de *P. vulgaris* mediada por *A. rhizogenes* K599**

La transformación de *P. vulgaris* se realizó siguiendo la técnica descrita por Estrada-Navarrete y colaboradores (Estrada-Navarrete et al., 2006). Las cepas de *A. rhizogenes* K599 con la construcción de interés fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente durante 2 días a 28 °C. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de agua estéril, obteniendo una solución saturada. Plantas de poroto crecidas durante 5 días en potes fueron inoculadas mediante 3 inyecciones con jeringa Hamilton con una suspensión de *A. rhizogenes* en el nodo del cotiledón. Las plantas inoculadas fueron colocadas en recipientes plásticos cerrados y fueron regadas con medio Fahraeus

con  $\text{KNO}_3$  con el fin de generar una atmósfera con alta humedad que favorezca la infección bacteriana. Posteriormente, las plantas fueron incubadas en cámara de cultivo a  $26\text{ }^\circ\text{C}$  y  $80\%$  de humedad durante 15 días, momento en que las raíces transgénicas (*hairy roots*) tienen aproximadamente 3 cm de largo. Por último, se corta el tallo 1 cm por debajo del cotiledón para remover la raíz salvaje y la parte aérea junto con las raíces transgénicas son transferidas a cajas acrílicas (17 cm. x 22 cm. x 4.5 cm) con medio agar Fahraeus inclinado sin  $\text{KNO}_3$ . Para prevenir que las raíces atraviesen el medio se depositó una hoja de papel estéril. Las plantas se incubaron en cámara de cultivo, en las condiciones descriptas previamente.



**Figura 28. Obtención de raíces transgénicas en *P. vulgaris*.** **A.** Inoculación con la cepa K599 de *A. rhizogenes* conteniendo el plásmido de interés en la base de los cotiledones utilizando una jeringa con aguja. **B.** Imagen de raíces transgénicas en desarrollo. **C.** Planta compuesta de *P. vulgaris* transferidas a cajas de acrílico en la que se eliminó la raíz silvestre (*wild type*).

### 5.6. Inoculación de las raíces de *P. vulgaris* con *R. etli*

Luego de un período de incubación de 7 días en ausencia de nitrógeno, las plantas compuestas fueron inoculadas con 5 ml de YEM como control o 5 ml de un cultivo de *R. etli* en fase exponencial con una  $\text{OD}_{600}$  de 0,8. Para obtener el cultivo se estrió una cepa de *R. etli* que se incubó a  $28\text{ }^\circ\text{C}$  en una placa de Petri con medio sólido YEM-Rojo Congo

durante 48 horas a 28 °C. A partir de la placa se inoculó un precultivo líquido de 5 ml de YEM que se incubó por 48 horas a 28 °C y 250 rpm. A partir de estos precultivos, se inocularon erlenmeyers conteniendo medio YEM (dilución 1/100) y se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,8.

## **6. Caracterización fenotípica de plantas compuestas**

### **6.1. Análisis de eventos de infección (ITs)**

Para cuantificar y clasificar la progresión de los ITs se utilizaron plantas compuestas de *P. vulgaris* que fueron crecidas en cajas acrílicas con agar Fahraeus sin nitrato durante 7 días. Luego, se inocularon con 5 ml de cultivo de *R. etli* CFNX5 DsRed, que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente roja DsRed. Entre los 5-7 dpi se cuantificó el número de ITs por cm de raíz mediante un microscopio de fluorescencia IX51 OLYMPUS (Olympus Corporation). A su vez se clasificaron los eventos de infección de raíz en 3 grupos de acuerdo a la progresión: ITs en pelo radical, ITs que alcanzan la epidermis e ITs que alcanzan el córtex de la raíz. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas para cada ensayo.

### **6.2. Cuantificación del número y tamaño de los nódulos**

Previo al momento de la inoculación se observaron las raíces en una lupa de fluorescencia, y se descartaron aquellas raíces que no expresaban *gfp*. Los vectores utilizados para realizar análisis funcionales permiten la expresión de *gfp* bajo el promotor rolD como gen reportero. Se cuantificó el número de nódulos por raíz en las plantas compuestas a los 7, 14 y 21 dpi con *R. etli* del genotipo *nodC-α* o *nodC-δ*. Teniendo en cuenta que cada raíz de una planta compuesta es un evento de transformación independiente, se cuantificó el

número de nódulos por raíz transgénica. En todos los experimentos se incluyeron plantas inoculadas con YEM como control negativo de nodulación.

Para medir el tamaño de los nódulos se usaron plantas compuestas crecidas en cajas acrílicas con nódulos de 21 dpi. Los nódulos fueron fotografiados, incorporando una regla como escala. Se determinó el largo de cada nódulo utilizando la herramienta de medición del programa Adobe Photoshop v. 7.0. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad Prism v. 6. Se calculó la media  $\pm$  el desvío estándar y se determinó la significancia estadística de los datos mediante un t-test no apareado de dos colas. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo.

### **6.3. Cuantificación de la longitud de las raíces**

Para el análisis del fenotipo de raíz se llevaron a cabo mediciones a partir de fotos de plantas compuestas de *P. vulgaris* 7 dpi con *R. etli* crecidas en cajas de acrílico. Las raíces fueron fotografiadas incorporando una regla como escala. La longitud de las raíces principales y de las raíces laterales fue determinada utilizando la herramienta de medición del programa Adobe Photoshop v. 7.0. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software GraphPad Prism v. 6. Se calculó la media  $\pm$  el desvío estándar y se determinó la significancia estadística de los datos mediante un t-test no apareado de dos colas. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por cada ensayo, y se utilizaron al menos 10 plantas por construcción.

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

### **7.1. Extracción de DNA genómico**

El DNA genómico se obtuvo a partir de hojas de *P. vulgaris*. El tejido se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero. El polvo se transfirió a un tubo, se añadieron 400 µl de *buffer* de extracción (EDTA 10 mM, pH 8; Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 100 mM; 2-β mercaptoentanol 10 mM, SDS 1 % p/v) y se incubó 10 min a 65 °C. Luego, se adicionaron 145 µl de acetato de potasio 5 M pH 4,8 y se mezcló por inversión. La muestra se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó a 12000 *g* durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se incubó con 1 µl de RNAsa 10 mg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se precipitó el DNA con 400 µl de isopropanol durante 5 minutos y se centrifugó a 12000 *g* a 4 °C. Luego, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 800 µl de etanol 70 % v/v. Se centrifugó 5 minutos a 12000 *g* a 4 °C, se secó el precipitado a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el DNA en 50 µl de agua estéril. El DNA obtenido se conservó a 20 °C para su posterior uso. Para evaluar la integridad del gDNA se realizó una electroforesis no desnaturalizante en geles de agarosa 1,2 % p/V, donde se visualizó una sola banda de alto peso molecular.

### **7.2. Extracción de RNA total**

Para la extracción de RNA total se colectaron tejido de raíces y nódulos crecidas en cajas de acrílico o en potes a distintos tiempos, se pulverizaron con mortero y N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C. El RNA total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo provisto por el proveedor. Se adicionó 1 ml de Trizol a 200 mg de tejido pulverizado y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se

adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó la muestra vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos, seguido de una centrifugación a 12000  $g$  por 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, y se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol. A continuación se centrifugó a 12000  $g$  por 10 minutos a 4 °C y el precipitado fue lavado con etanol 70 %. Finalmente, el precipitado fue secado al aire y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua miliQ seguido de una incubación de 10 minutos a 55 °C. La concentración del RNA fue estimada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) a partir de la cuantificación de la absorbancia. La integridad del mismo fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). La presencia de bandas discretas correspondientes al RNA ribosomal, fueron indicadores de una buena integridad del RNA para ser usado como sustrato para reacciones enzimáticas. Las muestras de RNA fueron conservadas a – 80 °C hasta su utilización.

### **7.3. Tratamiento con DNAsa**

Para evitar la posible presencia DNA genómico que interfiera con las reacciones de RT-PCR, se digirió 1  $\mu$ g de RNA total con una unidad de la enzima RQ1 DNAsa libre de RNAsa (Promega) utilizando el buffer suministrado por el fabricante, en un volumen final de 10  $\mu$ l. Se incubó durante una hora a 37 °C, luego se adicionó 1  $\mu$ l de la solución Stop (EDTA 20 mM, Promega) y finalmente se incubó por 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima. Para verificar el éxito de la digestión con DNAsa, se realizó una PCR con *primers* para *EF1 $\alpha$* , que codifica el factor de elongación 1 $\alpha$  de *P. vulgaris*, según fuera descrito previamente por Peltzer-Meschini y colaboradores (2008), utilizando como molde una alícuota de la

mezcla de reacción. La ausencia de producto de amplificación fue tomada como criterio de RNA libre de DNA.

#### **7.4. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa**

La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA tratado con DNAsa. A cada muestra de RNA se le agregó 0,5 µg de oligodT, se incubó durante 5 minutos a 70 °C para evitar la formación de estructuras secundarias y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se agregaron 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Promega), dNTPs 0,5 mM y buffer 1X (Promega), en un volumen final de 25 µl con agua estéril. La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 42 °C. Finalmente se ajustó el volumen a 200 µl y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Para determinar el éxito de la reacción de síntesis, una alícuota de la mezcla de reacción fue utilizada como molde para una reacción de PCR utilizando *primers* para *EF1α*. La visualización de un producto de amplificación de 100 pb fue tomado como criterio de una síntesis de cDNA exitosa.

#### **7.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

Las reacciones de qRT-PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador CFX 96 Real Time System C1000 Thermal Cycler Bio-Rad, utilizando como molde 5 µl de una dilución 1/10 del cDNA sintetizado. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl con una concentración de 0,5 µM de cada *primer*, y 1 X del buffer iQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de amplificación fue el siguiente: una primera etapa a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos 52 °C y 20 segundos a 72 °C. Se realizaron dos réplicas técnicas, un control negativo sin cDNA para evaluar

contaminación y una curva de calibración con diluciones seriadas del cDNA para cada par de *primers* utilizados. La normalización de los datos fue realizada mediante la amplificación del fragmento correspondiente al gen *EF1 $\alpha$* . Los datos obtenidos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad v 6.0.

## 8. Análisis Bioinformáticos

### 8.1. Análisis general de secuencias y diseño de *primers*

Las secuencias de los vectores utilizados y los marcos abiertos de lectura fueron analizados mediante el software Serial Cloner ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)). El diseño de *primers* fue realizado usando Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

### 8.2. Bases de datos de secuencias genómicas

Se utilizó la base de datos de *P. vulgaris* v1.0, *M. truncatula* 4.0v1 y *A. thaliana* TAIR10 disponibles públicamente en Phytozome v12.1 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

### 8.3. Base de datos de expresión

Se utilizaron los datos de RNA-seq basados en el atlas de expresión génica del proto común de O'Rourke et al (2014) y los publicados por Roux et al (2014) para analizar los perfiles de expresión de los genes *PvCYCP4-1* y *PvIDN2*.

### 8.4. BLAST

Los miembros de cada familia de ciclinas se identificaron mediante un análisis de tBLASTn contra la base de datos genómica de *P. vulgaris*, utilizando como *queries* las secuencias

aminoacídicas de todos los miembros de la familia de ciclinas previamente descrita en *A. thaliana*.

### **8.5. Alineamiento de secuencias de proteínas**

Los alineamientos múltiples de secuencias de proteínas fueron realizados mediante Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### **8.6. Alineamiento filogenético**

Los análisis filogenéticos de la familia de ciclinas y de proteínas con dominio XH/XS fueron realizados con el programa MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>) a partir de los alineamientos múltiples obtenidos con Clustal Omega. Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método *neighbor-joining* y la opción de *bootstrap* con 1000 repeticiones. Los árboles filogenéticos fueron diagramados en una escala definida por las distancias evolutivas con el programa MEGA7. Las distancias evolutivas se consideran como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio.

## **9. Observaciones macrocópicas y microscópicas**

La observación del sistema radical para identificar las raíces transformadas que expresan la proteína fluorescente verde GFP se realizó en una lupa Leica MZFLIII (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes adquiridas en los campos visibles e irradiados con luz UV se digitalizaron con el programa Image-Pro Plus 5.1 (Inc. MD, U.S.A.). El seguimiento de la formación de hilos de infección (ITs) por la cepa de *R. etli* marcada con DsRed se realizó con un microscopio invertido Olympus IX51 utilizando luz blanca y UV con filtros apropiados (Olympus Corporation, ShinjukuTokio, Japón). Las imágenes fueron

capturadas usando una cámara Q-Color3 de alta resolución (Olympus Corporation). La microscopía confocal de raíces de *P. vulgaris* fue realizada con un microscopio confocal Leica (SP5) con objetivos 20X y 40X. Las muestras se excitaron con láser de Argón y los espectros de emisión utilizados para detectar las fluorescencias fue GFP (498nm - 550nm). Las imágenes fueron capturadas por la cámara del microscopio con el programa Leica Application Suite (Leica) (servicio provisto por la plataforma de microscopía avanzada PMA-FCEN, de la Universidad Nacional de La Plata).

## **10. Inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP)**

### **10.1. Preparación de la muestra**

Para la preparación de la muestra, 100mg de tejido vegetal fresco (100 mg= 0.25 ml) fueron pulverizados con nitrógeno líquido y reservados a -80 °C para su posterior uso.

### **10.2. Extracción de DNA utilizando CTAB**

Para extraer el DNA mediante el método CTAB. Se añadieron 600 µl de buffer CTAB + β-mercapto precalentado a 65°C, luego se incubó la muestra durante 30 min a 65°C (realizar un vórtex cada 10 min). Se añadió 1 volúmen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se realizó un vórtex por 15 seg. Se centrifugó por 10 min a 5000 g. Posteriormente, se tomó la fase superior (500 µl aprox.) Se añadió 0.6 vol. de isopropanol y se procedió a mezclar invirtiendo los tubos. Luego se precipitó por 20 min a -20 °C y se centrifugó el precipitado por 15 min a 12000g. Se descartó el sobrenadante, se lavó con 500 µl de EtOH al 70 % y se centrifugó a 12000 rpm, 5 min a 4 °C. Por último se secó y resuspendió el pellet en 50 µl

de agua libre de DNAsa. Se incubó por 10 min a 70°C y se trató con RNAsa A (1 µl por 1 µg de DNA) por 30 min a 37°C.

### **10.3. Sonicación del DNA**

Luego de extraer el DNA se procedió a la sonicación del mismo. Se ajustaron las muestras a una concentración final de 1µg en un volumen de 300 µl. Se sonicó en un Refrigerated PicoRuptor 6 tubos por ronda, 4 ciclos de 30" ON - 30" OFF. Se tomó el 10% del volumen para cada IP (INPUT SAMPLE) y se conservó a -20 °C. Posteriormente, se incubó 10 min a 95 °C y se enfrió inmediatamente en hielo durante 5 min.

### **10.4. Inmunoprecipitación**

Tomamos 25 µl de Proteina G Dynabeads por muestra en tubos separados. Como control negativo usamos anti IgG anticuerpos.

Beads-Ab coating: Lavamos dos veces las perlas con 1 ml de tampón de dilución CHIP utilizando el campo magnético para eliminar el sobrenadante. Añadimos 1ml más de CHIP Dilution Buffer y 0,5 µl del Ab correspondiente por tubo. Incubamos las perlas + Ab 1h a temperatura ambiente. Retiramos el líquido en el campo magnético. Luego, lavamos dos veces las perlas en 1 ml de tampón de dilución CHIP utilizando el campo magnético para eliminar el sobrenadante. Agregamos 1 ml de CHIP Dilution Buffer y transferimos las perlas a un tubo nuevo. Retiramos el líquido en el campo magnético. Posteriormente, transferimos las muestras del paso 14 a los tubos con las perlas + Ab (paso 19) y agregamos el tampón de dilución CHIP hasta un volumen final de 1 ml. Por último, incubamos ON a 4 °C en rotación suave.

### **10.5. Lavado**

Colocamos los tubos en el separador magnético (en hielo). Esperamos hasta que se aclare y retiramos el sobrenadante. Agregamos 1 ml de tampón de dilución CHIP frío y transferimos la suspensión a un tubo nuevo. Lavamos con tampón de dilución CHIP frío cuatro veces, durante 5 min en un rotador a 4 °C, eliminando siempre el sobrenadante en el separador magnético en hielo.

### **10.6. Reverse Crosslink y purificación del DNA**

Primero resuspendimos las perlas después de los lavados en 500 ul de PK Buffer. Transferimos a un tubo nuevo y agregamos 2 µl de 20 mg/ml de proteinasa K a cada muestra. Incubamos durante 2 h a 55-65 °C y durante 15 min a 95°C. Luego, giramos los tubos y los colocamos en el campo magnético, incubamos por 3min en hielo y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo libre de DNAasa de 2mL. Purificamos el DNA mediante la extracción típica Ph-ChI-IsoA (25:24:1) e incubamos a -80°C ON. Luego centrifugamos a 12000 rpm, 30 min, 4 °C. Lavamos con 500 µl de EtOH al 70%. Centrifugamos a 12000 rpm, 5 min, 4 °C y secamos. Resuspendimos en 15 µl de agua libre de DNAasa complementada con 0,5 µl de RNAasa A y conservamos a 4 °C mientras se realizaba las qPCR.

### **Soluciones para MeDIP en plantas**

<b>CTAB Buffer</b>	<b>Para 10 ml</b>
2% CTAB	0,2 grs
1,4M NaCl	4,66ml of 3M
100mM Tris ph8	1ml of 1M
20mM EDTA	0,4ml of 0,5M
0,2 % mercapto	20ul
H <sub>2</sub> O hasta volumen	

**ChIP Dilution Buffer**

1.1% TRITON X100  
1.2EDTA  
16.7mM Tris-HCl pH8  
167mM NaCl  
H<sub>2</sub>O hasta volume.

**Para 100 ml**

5.5 ml 20%  
240 µl of 0.5M  
1670 µl of 1M  
5567 µl of 3M

**PK (Elution) Buffer**

100mM Tris-HCl pH 7,4  
50mM NaCl  
10mM EDTA  
H<sub>2</sub>O hasta volumen

**Para 1 ml**

100µl of 1M  
17µl of 3M  
20µl of 0,5M

# ANEXO

**Tabla 2:** *Primers* utilizados en este trabajo

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5'-3')
qxh-xs F	GGGTGAAGGGGCATATAAAGCAG
qxh-xs R	GAGTTCAGGAAGTAACTAAGCAGCA
xh-xs RNAi F	<u>CACCC</u> CAGTGGGCGATACTTAACC
xh-xs RNAi R	CCATAATGCTTGCCAATAACTGG
PvCYCP4-1 RNAi F	<u>CACC</u> CTGATTCAGCCACTGACCTTTG
PvCYCP4-1 RNAi R	GAGACACAAAGAAGTAAGAAGAGTGCTC
qPvCYCP4-1 F	GAGCACTCTTCTTACTTCTTTGTGTCTC
qPvCYCP4-1 R	TACCAGACTTATCTAGCCAGACTGTAA
promPvCYCP4-1 F	<u>CACCG</u> TAGCCTAAATCCACCTCATTCTAGC
promPvCYCP4-1 R	TGGATTGGTGATGTCTCTTTGCTG
qPv010G044800 F	TCTGTTGCATCAAAACCTTGCTG
qPv010G044800 R	CTTCTGAACTGAGATGTTTGGTCGT
qPv001G151100 F	ATCTGGGTGGGGCTGATATG
qPv001G151100 R	AAGTGATAAAACCCGAGGAGCT
qEF1- $\alpha$ F	AACTACCACCGGCCACTTGAT
qEF1- $\alpha$ R	AGCACCCAGGCATACTTGAAT
qERN F	CTTCTCGAATTCGGAATCTT
qERN R	TGTTGCCATTGCCATTGTT
qENOD40 F	AGTTTTGTTGGCAAGCATCC
qENOD40 R	TAAGCGCAAGCAAACCTGTTG
qCDC25 F	TTGCAAAGGAGAGTGAGAG
qCDC25 R	GTAATCATAATAGTGGTCATCCGAC
M13 F	GTAAAACGACGGCCAG
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC
MedipPv003G068700 F	AAGGCAACGTTTCAGCAGTTC
MedipPv003G068700 R	TCCGCCTTGCTACCAACAAT
MedipPv004G122000 F	ACACGTGGAACAAGCAGTTAC
MedipPv004G122000 R	ATCTGGGCCAAGCAATTGATG
MedipPv002G180800 F	GGAGGCACGTCCATAAAC
MedipPv002G180800 R	CTGGAGCTCAAACCTCAG

# **BIBLIOGRAFÍA**

Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 13548-13553.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Amarger, N. (2001). Rhizobia in the Field. *Advances* 73: 109–168.

Ane, J., Kiss G., Riely B., Penmetsa R., Oldroyd G.E., et. al. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science*. 303: 1364-1367.

Ausin, I., Mockler, T.C., Chory, J. and Jacobsen, S.E. (2009). IDN1 and IDN2 are required for *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 1325–1327.

Ausin, I., Greenberg, M.V.C., Simanshu, D.K., Hale, C.J., Vashisht, A.A., Simon, S.A., Lee, T.-F., Feng, S., Española, S.D., Meyers, B.C., et al. (2012). INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 8374–8381.

Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64:137–59.

Ballif, J., Endo, S., Kotani, M., MacAdam, J., Wu, Y. (2011). Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 49, 579-583.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136: 215–233.

Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Rípodas, C., Ariel, F., Frances, L., Crespi, M., Gamas, P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel A. (2015). A phylogenetically conserved group of nuclear factor-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes. *Plant physiology* 169, 2761 -2773.

Bateman, A. (2002). The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC Bioinformatics* 3:21.

Battaglia, M., Rípodas, C., Clúa, J., Baudin, M., Aguilar, O. M., Niebel, A., et al. (2014). A nuclear factor Y interacting protein of the GRAS family is required for nodule organogenesis, infection thread progression, and lateral root growth. *Plant Physiol.* 164, 1430–1442.

Bendris, N., Lemmers, B., Blanchard, J.M. (2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*. 14(12):1786-98.

Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A., and Lifschitz, E. (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* 46, 462-476.

Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep.* 10, 649–654.

Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., et al.(2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol.* 197, 300–313.

Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., and Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 788-796.

Blanco, F.A., Meschini, E.P., Zanetti, M.E., and Aguilar, O.M. (2009). A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association. *Plant Cell* 21: 2797–2810.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 695-700.

Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta.* 218: 683–692.

Bond, J.E., and Gresshoff, P.M. (1993). Soybean transformation to study molecular physiology. In *Plant Responses to the Environment*, pp. 25-44.

Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combier, J.P., Niebel, A., Crespi, M., and Frugier, F. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 54: 876–887.

Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., Benfey, P.N. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science.* 318(5851):801-6.

Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.

- Caretti, G., Salsi, V., Vecchi, C., Imbriano, C., and Mantovani, R. (2003). Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem* 278, 30435-30440.
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136:642–55.
- Castaingts, M., Kirolinko, C., Rivero, C., Artunian, J., Mancini Villagra, U., Blanco, F.A., Zanetti, M.E. (2022). Identification of conserved and new miRNAs that affect nodulation and strain selectivity in the *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli* symbiosis through differential analysis of host small RNAs. *New Phytol*. 234(4):1430-1447.
- Castel, S., Martienssen, R. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet*. 14, 100–112.
- Ceribelli, M., Dolfini, D., Merico, D., Gatta, R., Vigano, A.M., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2008). The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol Cell Biol* 28, 2047-2058.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M. (2008). Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20: 3467–79.
- Charpentier, M., Sun, J., Vaz Martins, T., Radhakrishnan, G. V, Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A.-A., Sanders, D., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.D. (2016). Nuclear localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 352: 1102–5.
- Charron, A.J., Sibley, L.D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*. Nov;5(11):855-67.
- Clúa, J. (2018). Bases moleculares de la interacción simbiótica eficiente entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. <https://doi.org/10.35537/10915/65934>
- Clúa, J., Rivero, C., Roda, C., Giorgis, C., Donna, S., Zanetti, M.E., Blanco, F. (2022). Transcriptomic analysis of Mesoamerican and Andean *Phaseolus vulgaris* accessions revealed mRNAs and lncRNAs associated with strain selectivity during symbiosis. *Scientific Reports* 12, 2614.
- Combiér, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., et al. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* 20, 3084-3088.

Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (1994). *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* 13, 5099-5112.

Dalla Vía, V. (2014). Estudio de las bases moleculares de la interacción *P. vulgaris-R. etli* durante las etapas tempranas de la simbiosis. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. <https://doi.org/10.35537/10915/42677>

Dalla Vía, V., Narduzzi, C., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A. (2015). Changes in the common bean transcriptome in response to secreted and surface signal molecules of *Rhizobium etli*. *Plant Physiol.* 169: 1356–1370.

Delaux, P.M., Radhakrishnan, G., Oldroyd, G. (2015). Tracing the evolutionary path to nitrogenfixing crops. *Curr Opin Plant Biol* 26: 95–99

Deleris, A., Halter, T., Navarro, L. (2016) DNA methylation and demethylation in plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.* 54:579–603.

D'Haese, W. and M. Holsters. (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* 12(6): p. 79R-105R.

Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010. 34(2): p. 150-170.

Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.

Duhamel, M. and Vandenkoornhuyse, P. (2013). Sustainable agriculture: possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci.* 18: 597–600.

Ehrhardt, A.G., Frankish, N., Isenberg, G. (1996). A large-conductance K<sup>+</sup> channel that is inhibited by the cytoskeleton in the smooth muscle cell line DDT1MF-2. *J Physiol* 496: 663–676

Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A.C., Kent Peters, N., Noel, K.D. (1994). Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Appl Environ Microbiol.* 60(9):3315-22.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–66

Engstrom, E.M., Ehrhardt, D.W., Mitra, R.M., and Long, S.R. (2002). Pharmacological analysis of nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the requirement of type iia calcium pumps and phosphoinositide signaling. *Plant Physiology* 128, 1390-1401.

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P.M., Sánchez, F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus spp.* : A tool for functional genomics. 19: 1385–1393.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61–76.

Finke, A., Kuhlmann, M., Mette, M.F. (2012). IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics.* 7, 950-60.

Fowler, D., Pyle, J. a, Raven, J. a, Sutton, M. a, and B, P.T.R.S. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368: 20130164.

Franssen, H. J., Vijn, I., Yang, W. C. & Bisseling, T. (1992). Developmental aspects of the Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., and Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137, 1228-1235

Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2): 280-300

Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A. (2008), Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* (80- ) 320: 889–892

Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K. & Bliss, F. (1986). Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40, 451–468.

Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol.* 137(4):1228-35.

Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 2669-2673.

Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42: 413–441.

Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W, Oldroyd, G.E. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*. 29;441(7097):1149-52.

Glick, E., et al. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 157–161.

Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18: 2680–2693.

Grafi G (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* 268, 1–6.

Graham, P.H., Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.

Graham, P.H., Vance, C.P. (2014). Update on legume utilization legumes : importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872–877

Haag, J.R., Pikaard, C.S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 483-92.

He, X.J., Chen, T., Zhu, J.K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* 21:442-65.

He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H., Zhu, J.K. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell.* 1;137(3):498-508.

Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A. (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiology* 142, 1739-1750.

Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21, 545-557.

Horne, M.C., Goolsby, G.L., Donaldson, K.L., Tran, D., Neubauer, M., Wahl, A.F. (1996). Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *J Biol Chem* 271: 6050–6061.

Huang, L., Jones, A.M., Searle, I., Patel, K., Vogler, H., Hubner, N.C., Baulcombe, D.C. (2009). An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol.* 16(1):91-3.

Inzé, D.; De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40, 77–105.

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat Rev Micro* 5, 619-633.

Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., and Gianinazzi-Pearson, V. (2001). *Medicago truncatula* *ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 737-748.

Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308, 1786-1789.

Kami, J., Velasquez, V.B., Debouck, D.G., and Gepts, P. (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1101-1104.

Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 359–364.

Kanno, T., Habu, Y., (2011). siRNA-mediated chromatin maintenance and its function in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta.* 1809, 444-51.

Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7, 193-195.

Kevei, Z., Lougnon, G., Mergaert, P., Horváth, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E., Ané, JM. (2007). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19: 3974–89.

Kouchi, H., et al. (2004). Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 11: 263–274.

Kumimoto, R.W., Siriwardana, C.L., Gayler, K.K., Risinger, J.R., Siefers, N., Holt, B.F., III. (2013). NUCLEAR FACTOR Y transcription factors have both opposing and additive roles in ABA-mediated seed germination. *PLoS One.* 8, e59481.

Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N., and Holt, B.F., 3rd. (2010). NF-YC3, NFYC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperioddependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*.

Kwong, R.W., Bui, A.Q., Lee, H., Kwong, L.W., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J. (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell.* 15, 5-18.

Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science* 18, 1 57-166.

Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A. (2014). Two CCAAT box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J.*

Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., Mun, J.H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., and Niebel, A. (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* 65, 481-494.

Law, J., Jacobsen, S. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204–220.

Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Jacobsen, S.E. (2011) SHH1, a Homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genet.* 7(7): e1002195.

Lawlor, D.W., Lemaire, G. and Gastal, F. (2001) Nitrogen, plant growth and crop yield. In *Plant nitrogen*: Springer, pp. 343-367.

Lee, M.H., Kim, B., Song, S.K., Heo, J.O., Yu, N.I., Lee, S.A., Kim, M., Kim, D.G., Sohn, S.O., Lim, C.E., et al. (2008). Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 67: 659–670.

Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhou, B., Kulikova, O., et al. (2004). A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303:1361–64.

Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*. 93, 1195-1205.

Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637–40.

Mamidi, S., Rossi, M., Annam, D., Moghaddam, S., Lee, R., Papa, R., et al. (2011). Investigation of the domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris*) using multilocus sequence data. *Funct. Plant Biol.* 38, 953–967.

Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15-27.

Matzke, M., Mosher, R. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet.* 15, 394–408.

Matzke, M.A., Kanno, T., and Matzke, A.J.M. (2015). RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 243–267.

Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. In *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* E. K. James, J. I. Sprent, W. E. Dilworth and N. W.E., pp. 153–189, Springer, the Netherlands.

Megraw, M., Cumbie, J.S., Ivanchenko, M.G., and Filichkin, S.A. (2016). Small Genetic Circuits and MicroRNAs: Big Players in Polymerase II Transcriptional Control in Plants. *Plant Cell*. 28: 286–303.

Meschini, E. P., Blanco, F. A., Zanetti, M. E., Beker, M. P., Küster, H., Pühler, A., et al. (2008). Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 459–468.

- Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rouge, P., et al. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:912–21.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., and Oldroyd, G.E. (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19, 1221-1234.
- Mitra, R. M., Shaw, S. L. & Long, S. R. (2004). Six non nodulating plant mutants defective for Nod factor induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 10217–10222.
- Mourrain P, et al. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533–542.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., and Imberty, A. (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* 16, 801-809.
- Noel, K.D., K.A. Vandenbosch, and B. Kulpaca, Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J Bacteriol*, 1986. 168(3): p. 1392-401.
- Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T., Hyams, J.S. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J. Cell Sci.* 99, 669–674.
- O'Rourke, J.A., Iniguez, L.P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S.S., Jackson, S.A., McClean, P.E., Li, J., Dai, X., Zhao, P.X., et al. (2014). An RNA-Seq based gene 810 expression atlas of the common bean. *BMC Genomics.* 15 (1):866.
- Oldroyd, G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 252–263.
- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519–46.
- Pan, H., Stonoha-Arther, C., Wang, D. (2018). *Medicago* Plants Control Nodulation by Regulating Proteolysis of the Receptor-Like Kinase DMI2. *Plant Physiol* 177: 792–802
- Patriarca E.J., Tatè R., Ferraioli S., Iaccarino M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* ;234:201-62.
- Pecrix, Y., Sallet, E., Moreau, S., Bouchez, O., Carrere, S., Gouzy, J., Jardinaud, M.F., Gamas, P. (2022). DNA demethylation and hypermethylation are both required for late nodule development in *Medicago*. *Nat Plants.* 8(7):741-749.

Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 180-201.

Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* 18: 111–119.

Qin, Y., Ye, H., Tang, N., Xiong, L. (2009). Systematic identification of X1-homologous genes reveals a family involved in stress responses in rice. *Plant Molecular Biology* 71, 483–496.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585–592.

Rendón-Anaya, M. et al. (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biol.* 18: 60.

Ried, M.K., Antolín-Llovera, M., and Parniske, M. (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *eLife* 3.

Rípodas C, Via VD, Aguilar OM, Zanetti ME, Blanco FA. (2013). Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem.* 68:81-9.

Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Villafane, J., Blanco, F.A., Zanetti, M.E. (2019). The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 subunits of the heterotrimeric NF-Y transcription factor influence strain preference in the *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli* symbiosis. *Front Plant Sci* 10:221

Rípodas, C., Clua, J., Battaglia, M., Baudin, M., Niebel, A., Zanetti, M. E., Blanco, F. (2014). Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis: nuclear factors Ys and GRAS are two for tango. *Plant Signaling & Behavior*, 9(5), e28847.

Rogers, K., Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell.* 25:2383–99.

Rolfe, B.G., Gresshoff, P. (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 297-319.

Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., and Moras, D. (2003). The NF-YB/NFYC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* 278, 1336-1345.

- Rossi, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Nanni, L., Rau, D., Attene, G., et al. (2009). Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. *Evol. Appl.* 2, 504–522.
- Roth, L.E., and Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* 49, 13-23.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., et al. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* 77: 817–837
- Saha, S., Dutta, A., Bhattacharya, A., DasGupta, M. (2014). Intracellular catalytic domain of symbiosis receptor kinase hyperactivates spontaneous nodulation in absence of rhizobia. *Plant Physiol* 166: 1699–1708.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., Kawaguchi, M. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19: 610-624.
- Savouré, A., Magyar, Z., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. *EMBO J.* 13: 1093–1102
- Schallus, T., Jaechk, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feizi, T., et al (2008). Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. *Mol Biol Cell* 19: 3404–3414
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191-195.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S.M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M.A., Chovatia, M., Gepts, P., Goodstein, D.M., Gonzales, M., Hellsten, U., Hyten, D.L., Jia, G., Kelly, J.D., Kudrna, D., Lee, R., Richard, M.M., Miklas, P.N., Osorno, J.M., Rodrigues, J., Thareau, V., Urrea, C.A., Wang, M., Yu, Y., Zhang, M., Wing, R.A., Cregan, P.B., Rokhsar, D.S., and Jackson, S.A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46, 707-713.

- Shaw, S.L., Long, S.R. (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* roots hair cells. *Plant Physiol* 131: 976–984
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M. (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host & Microbe* 15, 139-152.
- Siriwardana, C.L., Kumimoto, R.W., Jones, D.S., Holt, B.F. (2014). Gene family analysis of the Arabidopsis NF-YA transcription factors reveals opposing abscisic acid responses during seed germination. *Plant Molecular Biology Reporter / Ispmb* 32, 971-986.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308, 1789-1791.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S., Baulcombe, D.C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19(5):1507-21.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M. (2013). NODULE INCEPTION directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics* 9, e1003352.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, et al. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417:959–62.
- Subramanian, S., Fu, Y., Sunkar, R., Barbazuk, W.B., Zhu, J.K., and Yu, O. (2008). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* 9: 1 –14.
- Sutton, M. (2011). Too much of a good thing. *Nature* 472: 159-161.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 21: 1677–8.
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., Chen, M. (2004). Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 54: 519–532.
- Tirichine, L. et al. (2006). Dereglulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441, 1153–1156.

- Torres Acosta, J.A., de Almeida Engler, J., Raes, J., Magyar, Z., De Groot, R., Inz, D., and De Veylder, L. (2004). Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1485–1497.
- Van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W. (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. *Science* 257, 70-72.
- Vizgarra, O.N., Espeche, C.M., Ploper, L.D. (2016). Manual técnico del cultivo del poroto para el noroeste Argentino. Tucumán: Estación Experimental Obispo Colombres.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., Depamphilis, C.W., Ma, H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* 135, 1084–1099.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., Pikaard, C.S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet.* 41, 630-4.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* 141: 3517–28.
- Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O., Yu, B (2012). A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 40, 4422-31.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants ed. Detlef Weigel. *PLoS Biology.* 2: e104.
- Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T. (1994). Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6: 1415–1426.
- Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., et al. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:20540–45.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M. (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* 22: 4142–4157.

- Zhang, C.J., Ning, Y.Q., Zhang, S.W., Chen, Q., Shao, C.R., Guo, Y.W., Zhou, J.X., Li, L., Chen, S., He, X.J. (2012). IDN2 and its paralogs form a complex required for RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genet.* 8(5):e1002693.
- Zhang, H., Ma, Z.-Y., Zeng, L., Tanaka, K., Zhang, C.-J., Ma, J. et al (2013). DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8290–8295.
- Zhao, Y., Mo, B., Chen, X. (2012). Mechanisms that impact microRNA stability in plants. *RNA Biology.* 9: 1218–1223.
- Zheng, Z., Xing, Y., He, X.J., Li, W., Hu, Y., Yadav, S.K., Oh, J., Zhu, J.K. (2010). An SGS3-like protein functions in RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 1;62(1):92-9.
- Zhu, Y., Rowley, M.J., Bohmdorfer, G., Wierzbicki, A.T. (2013). A SWI/SNF chromatin remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol Cell.* 49, 298-309.