

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



"Mecanismos moleculares que determinan la
arquitectura de las raíces de las leguminosas"

Tesis para optar por el Título de Doctor en Ciencias Biológicas

Año 2010

Autor: Lic. Federico Damián Ariel

Dirección: Dra. Raquel Lía Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral
(CONICET/UNL)

*A mis viejos,
Silvia y Salva.*

“No me parece que la luciérnaga extraiga mayor suficiencia del hecho incontrovertible de que es una de las maravillas más fenomenales de este circo, y sin embargo baste suponerle una conciencia para comprender que cada vez que se le encandila la barriguita el bicho de luz debe sentir como una cosquilla de privilegio.”

(Rayuela, capítulo 1. Julio Cortázar)

Como dijo el poeta argentino Rodolfo Fito Páez en una de sus canciones, “... *no todo en tu vida depende tan sólo de vos...*”. Compartiendo con tanto gusto esta idea, quiero aprovechar a plasmar en estas primeras páginas mi agradecimiento a todos aquellos que me ayudaron, apoyaron y acompañaron en este camino, que trasciende los cortos años de la Carrera de Doctorado. Y aunque resulte extenso, me voy a tomar el atrevimiento de agradecerles a todos.

A las Instituciones

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la posibilidad de llevar a cabo mis estudios universitarios y de posgrado.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), al que vi nacer, y del que con tanto gusto llegué a ser parte.

Al Institut des Sciences du Végétal del Centre National de la Recherche Scientifique (Gif sur Yvette, Francia), por permitirme llevar a cabo gran parte de mi trabajo de Tesis en la Institución.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las dos becas de Doctorado con que realicé mis estudios.

Al FONCyT (PICT 38103; PAV 137, PICT 37100/022), CONICET (PIP 6383) y CABBIO (2004/4), por haber financiado los proyectos en los que se enmarca este trabajo de Tesis.

Al Ministerio de Educación de la Nación y la Embajada Francesa en Argentina, por haberme otorgado la beca de co-tutela con la que financié la primera de las estadias científicas en Francia.

A la Fundación del Nuevo Banco de Santa Fe S.A., por haberme otorgado una beca para efectuar la segunda misión científica en Francia.

Al Programa ECOS-Sud entre Francia y Argentina, por haber financiado las dos últimas estadias en Francia.

A la Fundación Argentina en París y a la Dirección Nacional de Cooperación Internacional, por admitirme en la Casa Argentina en París, haciendo más fácil y amena mis estadias en Francia.

Al Grain Legumes Integrating Project (GLIP) por haberme becado para participar del the 6th European Conference on Grain Legumes (Lisboa, Portugal, 2007).

Al Programa de Movilidad Académico-Científica de la Universidad Nacional del Litoral por haber cubierto el costo de la inscripción al 4th International Conference on Legume Genomics and Genetics (Puerto Vallarta, México, 2008).

A mis directores y compañeros de trabajo

A la Dra. Raquel Chan, por haberme dirigido, no sólo durante la Carrera de Doctorado, sino desde mis inicios en la investigación científica. Por haberme ayudado a formar mi

propio criterio. Además, por todo lo compartido a lo largo de siete años, desde María Elena Walsh hasta las caminatas por Champs Elysées. Muchas gracias.

Al Dr. Martín Crespi, por su impecable dirección y por recibirme tan cálidamente en su laboratorio en Francia. También, por contagiarme constantemente su entusiasmo y ayudarme a descubrir que la ciencia es divertida y vale la pena disfrutarla. Por la amistad que tenemos. También le agradezco a Alejandra, Conrado y Francisco, por tantos buenos momentos.

Al Dr. Florian Frugier, por habernos invitado a participar de su proyecto. Por su extraordinaria dirección y las valiosas discusiones que mantuvimos. Muy especialmente por haberme ayudado a abordar el complejo mundo de la bioinformática.

A la Dra. Anouck Diet, o simplemente Anouck, mi amiga. Por todo lo que hemos disfrutado y afrontado juntos. Por las largas horas transformando raíces... Por su contribución inigualable a esta Tesis y a mi formación. Por los hermosos momentos vividos en Francia y en Argentina.

A la Dra. Véronique Gruber, por su entusiasmo y ayuda permanente, no sólo en lo que se refiere a la ciencia, sino por esos pequeños detalles de los que siempre se encargó durante mis estancias en Francia.

Al Dr. Andreas Niebel, por invitarnos a formar parte de tan interesante proyecto. Por su confianza y el mutuo respeto. Sobre todo, por nuestra amistad. También a la Dra. Fernanda Carvalho-Niebel, por su amabilidad y por sus valiosos comentarios sobre nuestro trabajo.

Al Dr. Daniel González, por el tiempo compartido en la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad y por sus comentarios constructivos.

Al Dr. Jan Lohmann y su grupo, por el excitante trabajo que compartimos acerca de WUSCHEL.

Al Dr. Juan Claus, por su labor como Secretario de Ciencia y Técnica y Coordinador del Comité de Ética y Seguridad. Por haberme ayudado siempre que pudiera hacerlo.

A la Bioquímica Adriana Ortolani, por su buena predisposición a resolver lo que se presente, y por estar siempre que la necesitara.

A todos mis compañeros del Comité de Ética y Seguridad: Silvia, Marta, María Eugenia, Juan Carlos, Víctor, Guillermo y Juan. También a los nuevos integrantes: Adriana y Nieves. Gracias por tantas discusiones fructíferas que contribuyeron a mi formación profesional.

Al Dr. Carlos Dezar, mi amigo Carlos, por sus continuos aportes teóricos, por su espíritu crítico. Sin dudas, por su gran amistad y por los tantos momentos compartidos durante estos años.

A Julieta, mi compañera de emociones. Por todo lo que nos hemos acompañado y ayudado. Fue un placer compartir la mesada y los mates.

A Toto, amigo de tantos años. Por los tiempos de facultad y en el laboratorio. Por su invaluable aporte en mi formación y su soporte técnico constante. También por las discusiones científicas.

A Agus, por compartir casi desde el comienzo nuestro camino en el laboratorio. Por las charlas, la música, las películas. Por todo eso que hace a la ciencia tanto como al resto de las cosas.

A Pablo, por los trabajos que hemos realizado juntos, por tantas buenas anécdotas.

A Matías, Harry, por su gran aporte como teginista. Por su constante buen humor, su admirable criterio científico y su constancia.

A Delfi, por su amistad, su compromiso y su calidez. Por las idas y vueltas de Paraná a Santa Fe. Por todo lo compartido dentro y fuera del laboratorio.

A Jesi, por desbordar alegría y mantener activa nuestra creatividad. Por su cariño.

A Kari, por lo que llegamos a compartir en estos últimos tiempos. Por su aporte, su gran compañerismo y su presencia.

A Elina, por su interés en lo que hago, por su apoyo, las discusiones y los hermosos momentos vividos.

A Ivi, por darme las primeras herramientas fundamentales para el estudio bioquímico de factores de transcripción. Por los vaivenes de la ciencia que hemos aprendido a disfrutar.

A Caro, por alentarme siempre a seguir adelante. Por su hermosa sonrisa.

A Nori, por la frescura con que renueva el ambiente de trabajo. Por su empuje.

A Grace, por sus críticas constructivas, su calidez, y por su excelencia como docente.

A Edu, por todo lo compartido en estos años, desde los comienzos de la carrera de grado.

A todos los otros integrantes del Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Biología Celular y Molecular. Por el intercambio constante y la buena relación.

A todos mis compañeros de Docencia, y especialmente a Rosa, Marta, Esteban y Laura. Por cubrirme cuando estuve ausente. Fue un gusto haber trabajado juntos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Enzimología Molecular de la Facultad, por su compañerismo y su buena predisposición.

A Philippe, por estar siempre dispuesto a ayudarme. Por nuestra amistad, y por los momentos compartidos en París y en Toulouse.

A Malo, por ayudarme a establecerme y encontrarme cómodo en París. Por haber compartido conmigo su mundo. Por todo lo que disfrutamos juntos en estos años.

A Willem y Marleen, por la valiosa relación que esconstruimos. Por tantas charlas acerca de por qué y para qué hacer ciencia. Por la contención que me dieron en París, y lo que nos divertimos juntos en Bélgica. Por su calidez, sus cervezas y sus papas fritas.

A Alexis, por el tiempo compartido en París, y por sus críticas constructivas sobre nuestro trabajo.

A Pilar, por la amistad que nos une desde que nos conocimos.

A Axel, por su envidiable actitud ante la vida y la ciencia. Por todo lo que nos divertimos juntos.

A Julie, por su capacidad de alegrar siempre al laboratorio.

A Ons, por el tiempo compartido en el laboratorio.

A Marianne, por el poco tiempo que tuvimos para trabajar juntos. Un placer.

A todos los integrantes del grupo de Martin Crespi y a los miembros del ISV-CNRS. Especialmente a Francisco, Laura, Florian, Loreto, Christine, Paulina, Khan, Olivier, Valérie, Ana, Marie, Arthur, Christine... Por ayudarme siempre que lo necesitara y por la agradable atmósfera de trabajo.

A Alejandro, Pablo y Vero, por facilitarnos de una u otra manera el trabajo en el laboratorio.

A mis antiguos docentes

A Silvia, mi maestra de 6^{to} Grado. Por haberme hablado por primera vez de una célula y del ADN. Por haberme dejado esa inquietud latente.

A María Elena, mi profe del taller de literatura. Por haberme enseñado a expresarme en palabras y a comprender lo que leo.

A Diego, un gran amigo. Por haberme acercado a la filosofía y a la reflexión.

A Nelita, mi amiga y profe de francés. Porque lo que fue un placer en su momento, se transformó en una de las herramientas de comunicación más valiosas con las que cuento.

A todas mis profes de inglés de *Advance*: Patri S., Analía, Ale M., Patri A., Paula, Ale S., Noemí... Por haberme dado la posibilidad de disfrutar el idioma, desde el juego de los primeros días hasta la rigurosidad de los últimos años. Por todas las puertas que me abrieron.

A mi familia y amigos

A mis papás, Silvia y Salvador, por su apoyo incondicional. Por su ayuda constante, su confianza en mí y sus críticas constructivas. Por la formación humana e intelectual que se esmeraron en darme. Por todo lo que nos divertimos juntos. Porque especialmente sin ellos, esta tesis no sería la misma.

A Gustavo, por acompañarme y compartir todo con tanta alegría. Por hacerme recordar todos los días lo importante que es disfrutar de la vida, más allá de los problemas. Por ser y estar, simplemente.

A Silvi y Ramiro, por acompañarme, alentarme y por todo lo que compartimos. Por ayudarme cada vez que los necesitara. Por la alegría que contagian.

A mi abuela Bechy, por enseñarme todo lo que sabe sobre las plantas. Por sus ganas de vivir. Por su paciencia ante mis ausencias.

A mi abuela Esther, por todos esos domingos al mediodía. Por escucharme tan atenta, tan amiga.

A mis tíos Clara y Marcelo. Por ser mis abuelos con todas las letras. Por acercarme a la lectura, al teatro, a la música. Por su cariño. Porque no sería lo mismo entender la ciencia sin haber leído *Dialéctica de la Naturaleza*.

A mis abuelos Aldo y Enrique. Aunque ya no estén, los tengo presentes.

A mi tía Cristi, por su amistad. Por disfrutar de mis logros y estar cerca siempre.

A mis tíos Marta y Gustavo, por ser de los pocos que entienden lo que hago. Por su aliento y tantos buenos momentos.

A mi tío Roberto, por estar siempre para ayudarme en lo que necesite. Por la hermosa relación que tenemos.

A mis tíos Lina y Claudio, por apoyarme e interesarse por lo que hago.

A todos mis primos, por lo que hemos compartido y seguimos compartiendo.

A Carozo, Tere, Vero, Rubén y Sofí. Por su afecto y contención.

A mi gran amiga Ana Julia. Por todo. Por las discusiones, por acompañarnos, por lo mucho que nos divertimos. Especialmente, por haber estado cerca en los momentos más duros.

A mis mejores amigos: Vero, Emi, Maru, Vani, Anto, Uli, Nono, Licha, Dibu y Herny. Porque hacen que todo sea más lindo. Por el gran cariño que nos tenemos y por la buena vida que compartimos.

A Juli y Guille, por la gran amistad que hemos construido en los últimos años. Por Villa Trull y sus anécdotas.

A mis amigos más recientes: Naty, Judith, Gerard, Vane, Lucas y Dani. Por estar tan presentes y alentarme en lo que hago.

A todos mis amigos y compañeros de Circo, y especialmente a Pao, Joki, Delfi, Gaby, Amanda, Debo, Vicky, Anita, Tama, Maxi, Duilio, David, Juan y Diego. Por lo importante que es fomentar la creatividad a la hora de hacer ciencia.

A mis compañeros de la Facu, especialmente a Luciana, Belén P., Belén B., Maru, Poli, Toto y Vidu, por todo lo que nos divertimos en aquellos años.

A mis amigos de la infancia: Brenda, Mechi, María, Gonza, Marto y Emi. Por la relación que seguimos conservando.

Este trabajo de Tesis fue desarrollado principalmente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IAL-CONICET/UNL) y la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. También se llevó a cabo en el Laboratorio del Dr. Martín Crespi en el Institut des Sciences du Végétal (CNRS-Gif sur Yvette), en Francia.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones:

Publicaciones en Revistas Científicas

- o **ARIEL FD**, DIET A, VERDNAUD M, GRUBER V, FRUGIER F, CHAN RL AND CRESPI M (2010): “Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1”. *The Plant Cell* 22(7):2171-83. ASPB Press.
- o **ARIEL FD**, DIET A, CRESPI M AND CHAN RL: “The LOB-like transcription factor MtLBD1 controls *Medicago truncatula* root architecture under salt stress”. *Plant Signaling & Behavior* 5:12. Lands Biosciences.
- o **ARIEL FD**, MANAVELLA PA, DEZAR CA AND CHAN RL (2007): “The true story of the HD-Zip family”. *Trends in Plant Science* 12(9):419-26. Cell Press.
- o PLET J, WASSON A, **ARIEL FD**, LE SIGNOR C, BAKER D, MATHESIUS U, CRESPI M AND FRUGIER F (2011): “Mt CRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*”. *The Plant Journal* 65(4):622-633. SEB Press.

Publicación actualmente en revisión

- o **ARIEL FD**, BRAULT M, PLET J, BLANCHET S, ICHANTÉ JL, IMBEAUD S, CARRERE S, DELACROIX H, CHAN RL, CRESPI M AND FRUGIER F (2011): “Transcriptional regulation of NSP2 during *Medicago truncatula* nodule organogenesis requires cytokinin-responsive *cis*-acting elements”.

Capítulo de Libro y Publicación en una Revista no indexada

- o **ARIEL FD**, MANAVELLA PA AND CHAN RL (2007): “Homeodomain-Leucine Zipper Proteins participating in abiotic stress response in plants” Chapter N°1 of the Book *Plant Stress and Biotechnology*. Edited by Devarajan Thangadurai, Wei Tang and Song-Quan Song. Jaipur, Oxford Book Company. ISBN 978-81-89473-10-5.
- o **ARIEL FD**, MANAVELLA PA, GIACOMELLI JI AND CHAN RL (2007): “HD-Zip I and II, Transcription Factors Involved in the Adaptive Response to Environmental Stress”. *Plant Stress* 1(2), 189-96. Global Science Books.

Además, durante el transcurso de la Tesis se trabajó en colaboración con otros proyectos, que dieron lugar a las siguientes **Publicaciones Científicas**:

- o BUSCH W, MIOTK A, **ARIEL FD**, ZHAO Z, FORNER J, DAUM J, SUZAKI T, SCHUSTER C, SCHULTHEISS SJ, LEIBFRIED A, HAUBEIß S, HA N, CHAN RL AND LOHMANN JU (2010): “Transcriptional control of a plant stem cell niche”. *Developmental Cell* 18(5):696-7. Cell Press.
- o MANAVELLA PA, DEZAR CA, **ARIEL FD** AND CHAN RL (2008): “The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up regulated in darkness acting as a repressor of the transcription of photosynthesis-related genes”. *Journal of Experimental Botany* 59(11): 3143-55. Oxford Journals.
- o MANAVELLA PA, DEZAR CA, **ARIEL FD** AND CHAN RL (2008): “Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower *HAHB4* promoter”. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(10): 860-67. Elsevier.

Algunos de los resultados obtenidos también fueron dados a conocer en las siguientes **Presentaciones a Congresos y Disertaciones**:

- o **ARIEL FD**, DIET A, VERDNAUD M, GRUBER V, FRUGIER F, CHAN RL AND CRESPI M: “Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1”. Invitado

para disertar en un Simposio por el Dr. Marcelo Yanovsky. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (**RAFV**). La Plata, Septiembre 2010.

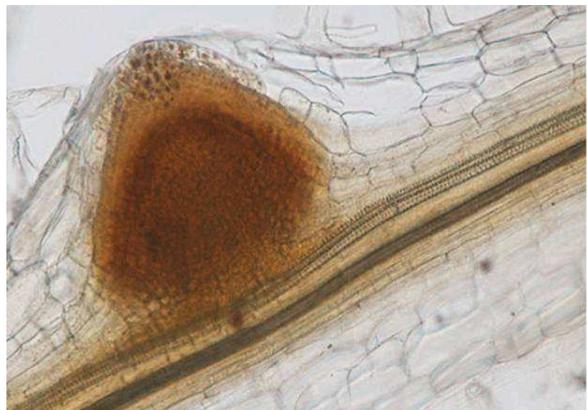
- **ARIEL, FD**: “Biochemical and Physiological Characterization of Transcription Factors Controlling *Medicago* Root Architecture”. Disertación en INRA/CNRS Toulouse, Francia. Invitado por el Dr. Andreas Niebel, junio de 2010.
- PLET, J; **ARIEL, FD**; VERDENAUD, M; GOUZY, J; CHAN, RL; CRESPI, M AND FRUGIER, F: “Cytokinin signaling in *Medicago truncatula* root and nodule organogenesis” 3rd International Symposium about Auxins and Cytokinins in Plant Development (**ACPD**). Praga, República Checa, julio de 2009.
- FRUGIER, F; LELANDAIS, C; DIET, A; **ARIEL, FD**; ZAHAF, O; NAYA, L; GRUBER, V; HARTMANN, C AND CRESPI, M: “Impact of salt stress on legume root architecture” 26th Annual Interdisciplinary Plant Group Symposium on Root Biology. St. Louis, Estados Unidos, mayo de 2009.
- DE LORENZO, L; MERCHAN, F; ZAHAF, O; LELANDAIS, C; NAYA, L; **ARIEL, FD**; DIET, A; HARTMANN, C; GRUBER, V; FRUGIER, F AND CRESPI, M: “How environmental stresses affect legume root architecture” 3rd **SMBBM** International Congress of Biochemistry, IUBMB Special Meeting on Plant Stresses & 6th Congress of **FASBMB**. Marrakech, Marruecos, abril de 2009.
- **ARIEL, FD**; PLET, J; CHAN, RL; CRESPI, M AND FRUGIER, F: “Cytokinin activation of *MtRR4*, a Response Regulator associated to symbiotic nodulation, is dependant on a B-Type RR DNA-core binding motif” 4th International Conference on Legume Genomics and Genetics (**ICLGGIV**). Puerto Vallarta, México, diciembre de 2008.
- **ARIEL, FD**; DIET, A; GRUBER, V; FRUGIER, F; CHAN, R AND CRESPI, M: “Functional and biochemical characterization of the transcription factor MTHB1 from *M. truncatula*” XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina

de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (**SAIB**). Carlos Paz, Argentina, noviembre de 2008.

- LELANDAIS, C; NAYA, L; ZAHAF, O; **ARIEL, FD**; PLET, J; LAFFONT, C; SALLET, E; CHAN, R; DIET, A; GRUBER, V; GOUZY, J; HARTMANN, C; FRUGIER, F and CRESPI, M: “How environmental stresses affect *M. truncatula* root architecture?” 4th International Conference on Legume Genomics and Genetics (**ICLGGIV**). Puerto Vallarta, México, diciembre de 2008.
- FRUGIER F, PLET J, **ARIEL FD**, BOUALEM A, LAFFONT C, LAPORTE P, JOVANOVIC M, NAYA L, CHAN R, SALLET E, GOUZY J, HARTMANN C, LELANDAIS C AND CRESPI M: “New pathways regulating *Medicago truncatula* root architecture” 8th European Nitrogen Fixation Conference. Gent, Bélgica, agosto de 2008.
- **ARIEL FD**, GRUBER V, DIET A, MANAVELLA PA, CRESPI M AND CHAN RL: “A novel conserved motif is present in the HD-Zip I transcription factor MTHB1 from *Medicago truncatula*” 6th European Conference on Grain Legumes (**GLIP**). Lisboa, Portugal, noviembre de 2007.
- **ARIEL FD**, GRUBER V, MANAVELLA PA, CRESPI M and CHAN RL: “Characterization of root *Medicago truncatula* transcription factors involved in salt stress response”. XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (**SAIB**). Rosario, Argentina, noviembre de 2006.
- MANAVELLA PA, DEZAR CA, **ARIEL FD**, DRINCOVICH MF and CHAN RL: “The biogenesis of the photosynthetic apparatus is repressed by the transcription factor Hahb-4”. XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (**SAIB**). Rosario, Argentina, noviembre de 2006.

- **ARIEL FD, ARCE AL and CHAN RL:** “Interaction of the plant homeodomain protein WUSCHEL with DNA”. 10th Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (**PABMB**) y XLI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (**SAIB**). Pinamar, Argentina, diciembre de 2005.

*Índice
y abreviaturas*



“Ser culto para ser libre.”

(José Martí)

Índice

Introducción	1
El movimiento de la naturaleza	2
La plasticidad del desarrollo en los vegetales	3
El sistema radicular como modelo de estudio de la plasticidad del desarrollo vegetal	4
Las características del sistema radicular	4
La diversidad morfológica de los sistemas radiculares	6
La formación de las raíces laterales	7
Los factores exógenos que influyen en la arquitectura radicular	8
El efecto del nitrógeno en el desarrollo de las raíces	8
El efecto del fósforo en el desarrollo de las raíces	9
El efecto del estrés abiótico en la modulación del sistema radicular	10
El rol de las hormonas en el sistema radicular	10
Las auxinas	11
Las citoquininas	12
El etileno	13
Las giberelinas	13
Los brasinoesteroides	13
El ácido abscísico	13
La modulación del sistema radicular por los factores bióticos	14
La interacción con las micorrizas	15
La interacción con bacterias: la formación de los nódulos simbióticos	15
La familia de las plantas leguminosas y el proceso de nodulación	15
<i>Medicago truncatula</i> como modelo del proceso de nodulación y del sistema radicular	18
La regulación de la expresión génica en las raíces de las leguminosas	19
Hipótesis y Objetivos	21
Materiales y Métodos	24
Material biológico	25
Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	26
Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	27
Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	27
Ligación de moléculas de ADN	28
Transformación de bacterias	28
Electrotransformación de <i>E. coli</i>	28
Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
Minipreparación de ADN plasmídico	29
Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	29
Tratamientos con NaCl, manitol y hormonas	30
Análisis de los niveles de transcritos por PCR en tiempo real	31
Análisis del fenotipo de la arquitectura radicular	31
Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i>	32
Expresión constitutiva de <i>MtHBI</i> y <i>LBD1</i> en las raíces de <i>M. truncatula</i>	33
Clonados correspondientes a los estudios transcripcionales	33

Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa	34
Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad β -glucuronidasa	35
Tinción de las raíces con lugol	36
Cuantificación de proteínas	36
Expresión de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	36
Electroforesis de proteínas	37
Purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad	38
Obtención de oligonucleótidos sintéticos doble hebra y marcación radioactiva de los mismos	39
Ensayos de retardo en geles	39
Ensayos de competencia	40
Selección de sitios de unión específicos (SELEX)	40
Síntesis y amplificación de oligonucleótidos doble hebra	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida y purificación de los fragmentos de ADN amplificados	41
Marcación radioactiva de oligonucleótidos doble hebra obtenidos por PCR	41
Clonado molecular de los oligonucleótidos seleccionados	42
Preparación de los extractos de proteínas nucleares	42
Ensayo de inmuno precipitación de la cromatina seguido de PCR	43
Ensayo de microarreglos, procesamiento de la información y análisis estadístico	44
Análisis bioinformático	45
Números de acceso	46
Tabla M.1 Lista de oligonucleótidos utilizados	47
Medios de cultivo utilizados en este trabajo	48
Soluciones	49
Capítulo 1: La regulación de la emergencia de las raíces laterales por el estrés medioambiental requiere de un factor de transcripción de la familia HD-Zip I, Mthb1, en <i>Medicago truncatula</i>	55
La súper familia de factores de transcripción con homeodominio	56
La súper familia de los homeodominios en plantas	57
La familia HD-Zip de factores de transcripción	58
La subfamilia HD-Zip I	62
Resultados	64
El efecto del estrés salino en la arquitectura y crecimiento radicular de <i>M. truncatula</i>	64
El estrés y el ABA inducen la expresión de <i>Mthb1</i>	66
Mthb1 regula la arquitectura radicular de <i>M. truncatula</i> : el efecto de su expresión constitutiva	69
Mthb1 regula la emergencia de las raíces laterales y mantiene el meristema: caracterización de las plantas mutantes <i>mthb1</i>	71
Mthb1 es un actor fundamental en el efecto que ejerce el medioambiente sobre la emergencia de raíces laterales de <i>Medicago truncatula</i>	73
Mthb1 reprime la expresión de un factor de transcripción de la familia LBD, regulado por las auxinas	77
Mthb1 reprime directamente a <i>MtLBD1</i> durante la formación de las raíces laterales	81

Los perfiles de expresión opuestos de <i>MtLBD1</i> y <i>MtHB1</i> se correlacionan con el efecto del estrés medioambiental sobre la acción de las auxinas durante la emergencia de las raíces laterales	88
Discusión	93
La interacción <i>MtHB1-MtLBD1</i> afecta la arquitectura radicular: la pulseada molecular entre el ambiente y las señales internas	93
Capítulo 2: Los factores de transcripción RRs de Tipo B regulan la expresión de genes involucrados en la nodulación en respuesta a las citoquininas	98
Las fitohormonas citoquininas y la nodulación	99
La Familia RR de Tipo B de Factores de Transcripción	101
Los Genes de Respuesta Primaria a las Citoquininas	103
Resultados	104
El análisis transcripcional de la respuesta a corto plazo a las citoquininas de los ápices de las raíces de <i>Medicago truncatula</i> : Nuevas vías funcionales de respuesta a estas fitohormonas	104
Identificación de un elemento <i>cis</i> reconocido <i>in vitro</i> por el RR de Tipo B <i>MtRR1</i> de <i>Medicago truncatula</i>	108
Las Cajas 1 a 4 participan de la regulación del gen <i>MtRR4</i> por las citoquininas <i>in planta</i>	112
Identificación de los elementos <i>cis</i> reconocidos por RRs de Tipo B en los promotores de los genes regulados por citoquininas	118
Las cajas del <i>ProMtNSP2</i> son funcionales y necesarias para la regulación por citoquininas durante el proceso de nodulación	122
Discusión	129
Conclusiones generales y perspectivas futuras	139
Resumen / Summary	143
Referencias	149
Anexo en CD	
Anexo 1: Tablas 2.1 a 2.5	
Artículos publicados	

Lista de Abreviaturas

Ac	acetato
ABA	ácido absísico
ABI	ABA INSENSITIVE
ABRE	ABA RESPONSIVE ELEMENT
ACC	1-aminociclopropano- 1-ácido carboxílico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ANR	ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED
AP2	APETALA2
APS	persulfato de amonio
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosina 5' trifosfato
AuxRE	AUXIN RESPONSE ELEMENT
BAP	bencil amino purina
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bZIP	basic LEUCINE ZIPPER
c.s.p.	cantidad suficiente para
c/u	cada uno
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina (del inglés, Chromatin Immunoprecipitation)
CHX	cicloheximida
Ci	Curie
col.	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
CRE	CYTOKININ RECEPTOR
CRF	CYTOKININ RESPONSE FACTOR
CKX	CYTOKININ OXIDASE
Da	daltons
dpi	días post inoculación

dATP	desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTP	mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
DO	densidad óptica
DRE	DROUGHT RESPONSIVE ELEMENT
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA	sal sódica del ácido etilén diamino tetraacético
ENOD	EARLY NODULATION
EREBP	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
ERN	ERF REQUIRED FOR NODULATION
EST	Etiquetas de Secuencias Expresadas (del inglés, Expressed Sequence Tags)
FC	Factor de Cambio
FT	Factor de Transcripción
GA	giberelinas
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GUS	β -GLUCURONIDASA
GST	GLUTATIÓN S-TRANSFERASA
HA	HEMOAGLUTININA
HD	homeodominio
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HK	HISTIDIN KINASA
IAA	ácido indolacético
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kpb	kilopares de bases
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo de Luria-Bertani
LOB	LATERAL ORGAN BOUNDARIES
LBD	LOB BINDING DOMAIN
Lj	<i>Lotus japonicus</i>
LZ	LEUCINE ZIPPER

miniprep	minipreparación de ADN plasmídico
miR	micro ARN
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
NAM	NO APICAL MERISTEM
NIN	NODULE INCEPTION
Nod	Nodulación
NSP	NODULE SIGNALING PATHWAY
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fósforo inorgánico
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
Poli(dIdC)	ácido polidesoxiinosínico-polidesoxicitidínico
Pro	Promotor
Pro-Mut	Promotor Mutagenizado
rpm	revoluciones por minuto
SCR	SCARECROW
SDS	dodecilsulfato de sodio
RR	RESPONSE REGULATOR
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TC	Consenso Tentativo (del inglés, Tentative Consensus)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N',-tetrametiletildiamina
TGE	Tris-Glicina-EDTA
TIR	TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT
Tris	N-tris-(hidroximetil)aminometano
U	unidad/es de actividad enzimática
UDP	uridín 5' difosfato
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido

Introducción



*“...hay muchas preguntas y
pocas respuestas...”
(Calle 13 + Café Tacuba)*

El movimiento de la naturaleza

Durante la Edad Media se elaboró una peculiar concepción general del mundo en la que imperaba la idea de “inmutabilidad absoluta de la naturaleza”. Según esta idea, independientemente de la forma en que hubieran nacido, una vez presentes, las cosas no cambiarían nunca. La Tierra siempre había tenido los mismos montes, valles y ríos, el mismo clima, la misma flora y la misma fauna; la única excepción era aquello alterado por el hombre. Las especies vegetales y animales habían sido establecidas de una vez para siempre y cada individuo siempre producía otros iguales a él. Linneo hizo en su momento una gran concesión al admitir que en algunos lugares, debido a las cruces, podrían haber surgido nuevas especies. En oposición a la historia de la humanidad, que se desarrolla en el tiempo, a la historia natural se le atribuía exclusivamente un desarrollo en el espacio. Se negaba todo cambio, toda evolución en la naturaleza. En la segunda mitad del siglo XIX, Engels (1875) describió la época antes de la transición a la ciencia moderna de la siguiente manera: “Las Ciencias Naturales de la primera mitad del siglo XVIII se hallaban tan por encima de la antigüedad griega en cuanto al volumen de sus conocimientos e incluso en cuanto a la sistematización de los datos, como por debajo en cuanto a la interpretación de los mismos y a la concepción general de la naturaleza. Para los filósofos griegos el mundo era, en esencia, algo surgido del caos, algo que se había desarrollado, que había *llegado a ser*. Para todos los naturalistas del siglo XVIII el mundo era algo osificado, inmutable, y para la mayoría de ellos algo creado de golpe. La Ciencia estaba aún profundamente empantanada en la Teología” (tomado de las Obras escogidas de Marx y Engels, 1974).

Fue recién en el siglo XIX que la Historia de las Ciencias Naturales logró dar un vuelco contundente sobre la interpretación del origen de las especies, emancipándose de la doctrina religiosa. Refiriéndose a este proceso de transformación que delineó los caminos que recorrió la Ciencia hasta nuestros días, Engels dijo en la introducción de su obra *Dialéctica de la Naturaleza* (1875): “Es notorio que casi al mismo tiempo que Kant atacaba la doctrina de la eternidad del sistema solar (1755), Wolff desencadenaba en 1759 el primer ataque contra la teoría de la constancia de las especies y proclamaba la teoría de la evolución. Pero lo que en él sólo era una anticipación brillante tomó una forma concreta en manos de Oken, Lamarck y Baer, y fue victoriosamente implantado en la ciencia por Darwin en 1859, exactamente cien años después. Casi al mismo tiempo quedó establecido que el protoplasma y la célula, considerados hasta entonces como los últimos constituyentes morfológicos de todos los organismos, eran también formas orgánicas inferiores con existencia independiente. La nueva concepción de la naturaleza hallábase ya trazada en sus rasgos fundamentales: toda rigidez se disolvió, todo lo inerte cobró movimiento, toda particularidad considerada como eterna resultó pasajera, y quedó demostrado que la naturaleza *se mueve*”.

Hoy sabemos que este concepto es no sólo aplicable a la evolución de las especies, sino que el movimiento de la naturaleza también se ve plasmado en el desarrollo de las plantas y en su dependencia del entorno. A esto lo llamamos “plasticidad del desarrollo” e implica la capacidad de las plantas de dar lugar a fenotipos diferentes aún contando con la misma carga hereditaria.

La plasticidad del desarrollo en los vegetales

En términos generales, una vez finalizada la embriogénesis, los animales cuentan con todos sus órganos dispuestos espacialmente de manera predeterminada (Figura I.1).

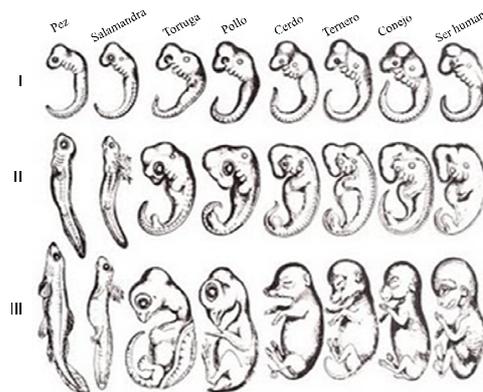


Figura I.1. Dibujo del biólogo alemán Ernest Haeckel (1868) comparando tres etapas del desarrollo embrionario de diferentes especies, incluyendo al hombre.

Dada su naturaleza sésil, las plantas necesitan adaptar su desarrollo post-embriionario a las características del ambiente. En comparación con los animales, las plantas muestran una asombrosa flexibilidad en el patrón de crecimiento y arquitectura en respuesta a los estímulos externos, gracias a la continua actividad de las regiones meristemáticas. La plasticidad del desarrollo permite que las plantas de un mismo genotipo den lugar a fenotipos diferentes dependiendo de las condiciones del ambiente. Los factores externos son capaces de modular los niveles y la señalización de las fitohormonas que controlan el proceso de adaptación.

Las hormonas vegetales coordinan el desarrollo en respuesta a los factores intrínsecos, tanto como a los ambientales. Los reguladores del desarrollo más destacados son las auxinas, los brasinoesteroides, las citoquininas y las giberelinas, mientras que el ácido abscísico, el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico están además más enfáticamente ligados a la respuesta al estrés (Wolters y Jürgens, 2009). Los estudios llevados a cabo durante las últimas dos décadas sobre las hormonas vegetales se basaron principalmente en el análisis de plantas mutantes. Estos trabajos permitieron identificar una gran lista de genes involucrados en la síntesis, catabolismo y señalización de las fitohormonas (Bishopp y col., 2006; Benková y col., 2009; Dugardeyn y col., 2008; Hirose y col., 2008). La identificación independiente de los mismos genes en respuesta a diferentes hormonas ha estimulado el avance de los estudios acerca del cruce entre sus vías de señalización (Schwechheimer y col., 2002; Benková y col., 2009). El desarrollo de la tecnología relacionada a los análisis transcripcionales y post-transcripcionales, en combinación con técnicas clásicas de bioquímica y biología molecular, ha permitido identificar componentes claves en el

metabolismo, la percepción y la señalización cruzada de las diferentes hormonas vegetales (Wolters y Jürgens, 2009).

El sistema radicular como modelo de estudio de la plasticidad del desarrollo vegetal

En la segunda mitad de su vida, Charles Darwin focalizó sus estudios en la biología de las plantas. De hecho, publicó varios libros, algunos de los cuales en colaboración con su hijo Francis, un eximio fisiólogo vegetal. En una de sus últimas publicaciones, *The power of movement of plants* (1880), Charles y Francis inauguraron una nueva etapa en la biología de las plantas, proponiendo que el ápice de las raíces parecería comportarse como el cerebro de los animales: “Consideramos que no existe estructura más maravillosa en la planta que el ápice de la raíz.” “No sería exagerado decir que el ápice, que tiene sensibilidad, cuenta con el poder de dirigir los movimientos de sus partes adjuntas, actuando como el cerebro de los animales inferiores” (citado por Kutschera y Niklas, 2009). La observación hace referencia al tropismo que dirige el crecimiento de las raíces. Hoy sabemos que el sistema radicular es verdaderamente una maravilla, y de vital importancia para el crecimiento y supervivencia de la planta.

La función principal de las raíces es absorber los macro y micro nutrientes, así como proveer el anclaje de las plantas al suelo. Sin embargo, también tienen funciones secundarias, tales como acumular fotosintatos, sintetizar fitohormonas y posibilitar la propagación clonal. Evolutivamente, la organización radicular ha progresado desde formas muy simples como los rizomas, hasta las más complejas, incluyendo la especialización de tejidos (Brundrett, 2004). Este proceso evolutivo fue seguramente guiado por la presión que ejerce el medio sobre la raíz como instrumento para enfrentar las condiciones desfavorables que amenazan el crecimiento y la reproducción de las plantas: la presencia de compuestos peligrosos en el suelo, la limitación del agua y los nutrientes, y la competencia subterránea con las otras especies por los recursos disponibles (Osmont y col., 2007). Entonces, la competitividad de un sistema radicular, dada la composición del suelo, depende de su morfología y arquitectura (Fitter, 1986). Esta presión evolutiva logró no sólo que las plantas alcancen un sistema radicular más complejo, sino que además desarrollen la capacidad de adaptar su sistema radicular para responder a las condiciones cambiantes del entorno. La arquitectura y el crecimiento de las raíces muestran una plasticidad extraordinaria que varía entre especies por estar conjugada con el control inherente de los factores genéticos. Dichas señales internas están moduladas por los factores bióticos y abióticos del ambiente y regulan el perfil de la expresión génica. El resultado se plasma en la modificación del sistema radicular, especialmente en el número y disposición de las ramificaciones (Osmont y col., 2007; Wolters y Jürgens, 2009).

Las características del sistema radicular

Las raíces se encuentran adaptadas para el anclaje y el crecimiento a través del suelo, y para la absorción de agua y minerales. Estas funciones han ejercido una presión en la evolución de la estructura radicular. Por ejemplo, los apéndices laterales interferirían en la penetración a la tierra, por lo que, a diferencia de lo que ocurre en el tallo, estos órganos no nacen del meristema apical. Las ramificaciones radicales se

generan internamente, y se forman sólo en regiones maduras de la raíz a partir de un meristema creado *de novo* (Taiz y Zeiger, 2006).

El sistema radicular de una planta dicotiledónea típica se encuentra dominado por una raíz primaria, formada durante la embriogénesis. Los tejidos primarios son generados por el meristema apical de la raíz. Un examen minucioso de una raíz joven en desarrollo muestra, frecuentemente, 4 regiones o zonas (Figura I.2): 1) la caliptra, que protege del daño mecánico al meristema apical y segrega un lubricante (mucopolisacáridos) que facilita el movimiento a través del suelo; 2) la región de división celular, que está compuesta por un meristema apical en el centro de la punta de la raíz; 3) la región de elongación, en la que las células aumentan varias veces su tamaño y, aunque la división celular continúe, el índice decrece progresivamente a cero a medida que se incrementa la distancia al meristema; y 4) la región de maduración, en la que las células adquieren sus características diferenciales (Taiz y Zeiger, 2006). De estas regiones, las tres últimas presentan límites no bien definidos. Cabe destacar que las células de cada región muestran gradualmente las características de aquellas de la zona siguiente. Por otro lado, una de las características básicas de la raíz es su patrón radial, el cual está constituido por anillos o capas concéntricas de células de epidermis, córtex, endodermis y periciclo que rodea al tejido vascular (Hardtke, 2006; Figura I.2).

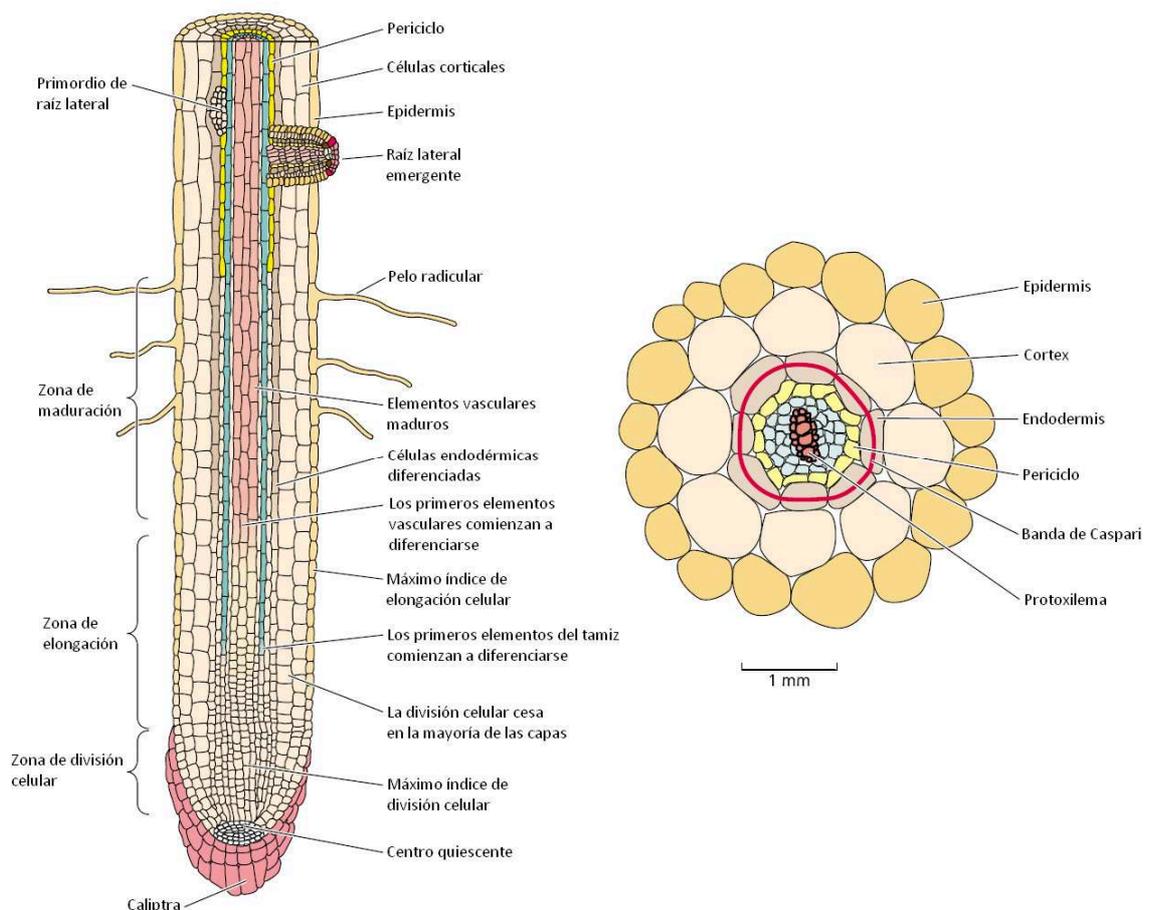


Figura I.2. La conformación de una raíz principal típica. A) Diagrama simplificado de una raíz primaria en el que se muestran las distintas zonas de la misma. B) Patrón radial

de los tejidos encontrados en el corte transversal de una raíz. Adaptado de Taiz y Zeiger, 2006.

En el ápice se encuentra localizado el centro quiescente, que mantiene dos tercios de las células meristemáticas que se dividen de manera asimétrica (Figura I.3; Hardtke, 2006). Las células meristemáticas del tercio inferior producen células hijas que se diferencian inmediatamente para reemplazar las células centrales de la caliptra que se daña por el crecimiento en el suelo. El tercio superior produce células hijas que eventualmente serán diferenciadas en tejidos específicos. Inicialmente, las células hijas del tercio superior que dejan el nicho meristemático central se dividen varias veces en la zona del meristema antes de comenzar a diferenciarse en las zonas de elongación y diferenciación propiamente dichas. La raíz, pues, muestra una zonación a través de la cual pasan las nuevas células al proliferar, elongarse y diferenciarse. Esta progresión del desarrollo celular se refleja en un patrón de expresión génica espacialmente distintivo (Brady y col., 2007; Dello Ioio y col., 2007 y 2008; Galinha y col., 2007; Ubeda-Tomás y col., 2008).

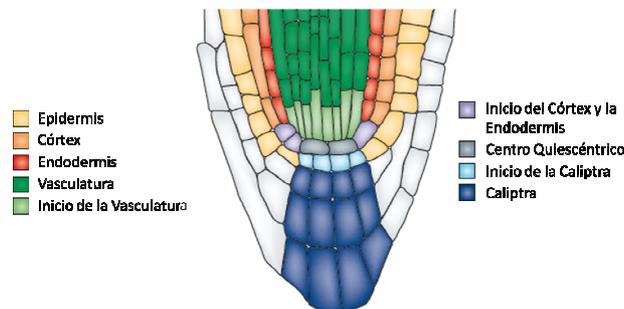


Figura I.3. Organización del meristema apical de la raíz. Los diferentes tipos de células están indicados en colores, referidos adecuadamente a ambos lados. Adaptado de Wolters y Jürgens, 2009.

La diversidad morfológica de los sistemas radiculares

El sistema radicular refleja la configuración espacial de las raíces de diferentes edades y órdenes e implica que la estructura global es funcionalmente importante (Lynch, 1995). El sistema radicular puede ser modificado mediante la inducción o inhibición del crecimiento de la raíz principal, la formación de raíces laterales o adventicias, o el crecimiento de los pelos radiculares. Está determinado por factores inherentes a cada especie vegetal y a su vez está modulado por el ambiente. Es decir, que la flexibilidad del desarrollo vegetal permite que un mismo individuo desarrolle un sistema radicular adaptado al medio circundante. El ambiente es capaz de regular los niveles y la señalización de las hormonas de la raíz, que a su vez determinan el patrón de expresión génica.

Aunque no existe una clasificación simple de los diferentes sistemas radiculares, es evidente que predominan dos tipos de arquitectura en las angiospermas (Figura I.4). La primera es típica de las plantas dicotiledóneas (Figura I.4A), incluyendo muchas especies modelo (*Arabidopsis*, tomate, arveja y *Medicago truncatula*, entre otras). Está compuesta de una raíz principal dominante y de raíces laterales de diferentes órdenes

(Osmont y col., 2007). El eje de crecimiento es paralelo a la raíz principal. La aparición de raíces adventicias es muy poco frecuente, pero éstas emergen ocasionalmente del hipocotilo si la raíz principal sufre daño mecánico.

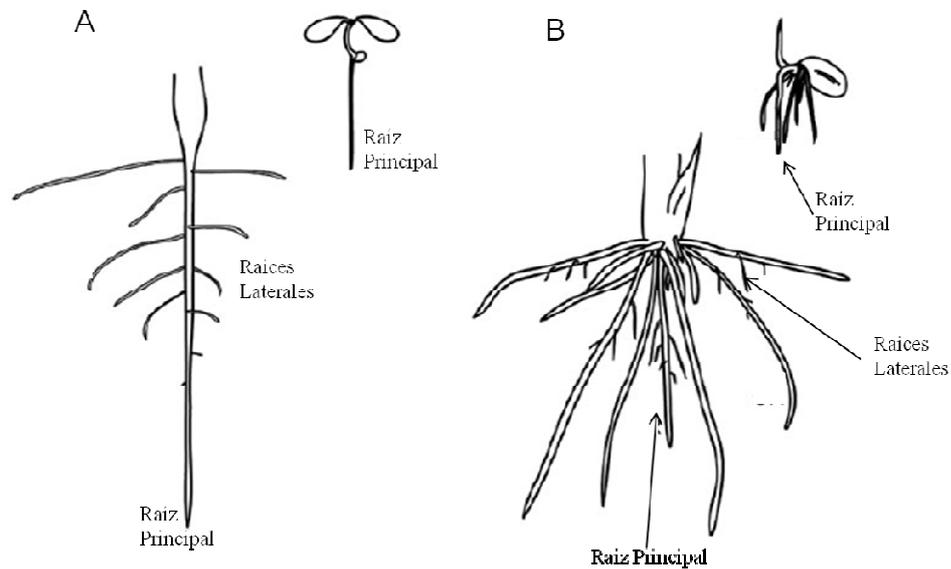


Figura I.4. Representación esquemática del sistema radicular de una plántula (derecha y arriba) y una planta típica (abajo e izquierda) de A) dicotiledóneas y B) monocotiledóneas. Adaptado de Osmont y col., 2007.

El sistema radicular que caracteriza a las monocotiledóneas cuenta con muchas raíces adventicias que rodean a la raíz principal (Figura I.4B). De hecho, la mayor parte del sistema radicular del maíz (*Zea mays*) y del arroz (*Oryza sativa*) está formado por raíces post-embriónicas que nacen de la base del tallo (Osmont y col., 2007). La formación adicional de raíces laterales da un aspecto tupido, característico de las monocotiledóneas (Figura I.4B).

La formación de las raíces laterales

Las raíces laterales se definen como aquellas que se originan a partir de otra raíz preexistente. Esto significa que puede derivar tanto de la raíz principal como de las adventicias o incluso de otra raíz lateral. Por lo tanto, constituyen casi todo el sistema radicular (Lloret y col., 1985). La raíz principal nace durante la embriogénesis, mientras que las raíces laterales se forman durante toda la vida de la planta. Las raíces laterales se originan a partir de las células del periciclo y a veces también a partir de la endodermis, en forma adyacente al xilema (en las dicotiledóneas) o del floema (en las monocotiledóneas; Casimiro y col., 2003). *Arabidopsis thaliana* es el modelo de estudio en el que se ha logrado describir más minuciosamente cómo tiene lugar la formación de las raíces laterales (Dolan y col., 1996; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro y col., 2001; Péret y col., 2009). En *Arabidopsis*, las raíces laterales se forman exclusivamente a partir de las células fundadoras del periciclo, adyacentes al xilema (Dolan y col., 1993). Una única célula, o un par de ellas, pasa por varias rondas de divisiones anticlinales

(ortogonal al eje de crecimiento; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro y col., 2001; Dubrovsky y col., 2001) hasta crear un primordio de una sola capa compuesta por diez pequeñas células de igual largo (Figura I.5 etapa I). Luego, las células se dividen de forma periclinal (paralela al eje de crecimiento), formando un primordio con una capa interna y otra externa (etapa II). Continuas divisiones peri y anticlinales dan lugar a un primordio con forma de domo (etapas III a VII) que eventualmente emergerá (etapa VIII) de la raíz parental (Casimiro y col., 2001; Dubrovsky y col., 2001; De Smet y col., 2006). La nueva raíz sufre entonces la activación de su propio meristema que guiará su elongación.

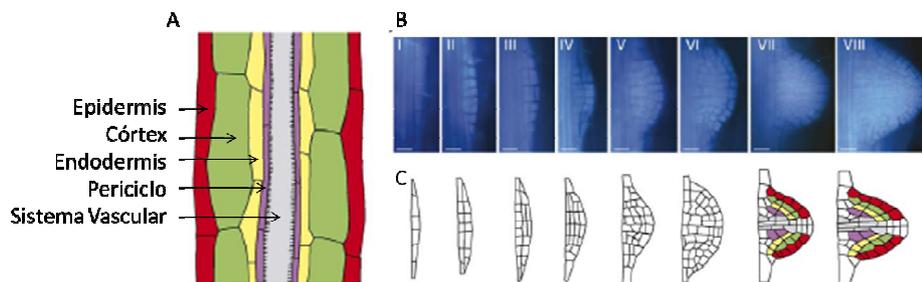


Figura I.5. Cambios morfológicos durante la formación de la raíz lateral. A) Esquema de las diferentes capas celulares presentes en la raíz, también indicados en (C). B) Las 8 etapas de la formación de la raíz lateral. Las fotos están tomadas luego de una tinción con azul de anilina. Las barras de la escala representan 20 μm. C) Representación esquemática de las ocho etapas. Adaptado de Péret y col., 2009b.

Los factores exógenos que influyen en la arquitectura radicular

El sistema radicular depende de numerosos factores bióticos y abióticos que determinan la composición heterogénea de los suelos. Aunque la plasticidad del desarrollo radicular está bien documentada, aún se desconoce la mayoría de los mecanismos moleculares que regulan tal flexibilidad. Sin embargo, un número creciente de análisis de mutantes (principalmente de *Arabidopsis*) ha contribuido al entendimiento de estas redes regulatorias. Entre los factores abióticos más importantes que determinan el crecimiento y arquitectura de las raíces podemos mencionar la falta de agua, el estrés salino y la disponibilidad de nutrientes, especialmente de nitrógeno y fósforo (Osmont y col., 2007). Otros nutrientes también influyen en el desarrollo de las raíces. Por ejemplo, en *Arabidopsis* la limitación del hierro reprime la elongación de las raíces laterales pero promueve su formación (Moog y col., 1995). Además, la carencia de sulfato incrementa fuertemente la ramificación de las raíces (López-Bucio y col., 2003).

El efecto del nitrógeno en el desarrollo de las raíces

Las fuentes principales de nitrógeno (N) en el suelo son el amonio, el nitrito y el nitrato. Existen dos mecanismos diferentes de absorción del N (Glass y col., 2002): uno de baja afinidad, que funciona cuando hay abundancia de N; y un sistema de transporte de alta afinidad que se activa cuando su concentración es limitada. En *Arabidopsis* se ha

observado que las altas concentraciones de N reducen la elongación de la raíz principal y de las laterales. La limitación en la disponibilidad de N, por el contrario, induce la elongación de las raíces (Linkohr y col., 2002). Sin embargo, cuando la distribución del N en el suelo no es uniforme, las regiones de alta concentración promueven el crecimiento de la zona radicular afectada (Drew y Saker, 1975). En conclusión, el crecimiento de las raíces laterales se inhibe sistemáticamente en respuesta a altos niveles globales de N, pero se induce localmente en respuesta a regiones de alta concentración. En este último tipo de respuesta juega un rol fundamental el factor de transcripción (FT) de *Arabidopsis* NITRATE-REGULATED1 (ANR1) de la familia MADS (Zhang y Forde, 1998), ya que un detrimento de su actividad se refleja en una respuesta anormal al N. También el transporte del N influye en la sensibilidad de la planta a su concentración y por ende en la ramificación de la raíz. Particularmente, los transportadores de la familia NRT2 de *Arabidopsis* son necesarios para la absorción del N cuando éste está en concentraciones limitantes (Glass y col., 2002). Además, se ha identificado una proteína de la familia NRT2 con funciones en la iniciación de las raíces laterales (Little y col., 2005). Cuando la relación de concentración de carbono respecto de la de N es muy alta, las plantas de *Arabidopsis* sufren una fuerte inhibición de la iniciación de las raíces laterales. Esta respuesta no se manifiesta en las líneas mutantes *lin1*, defectuosas en el transportador NRT2.1 (Malamy y Ryan, 2001; Glass y col., 2002). Otras fuentes de N que afectan el sistema radicular son el glutamato (Walch-Liu y col., 2006) y el óxido nítrico (Correa-Aragunde y col., 2004).

El efecto del fósforo en el desarrollo de las raíces

Después del N, el fósforo es el segundo macronutriente limitante más importante para el crecimiento de las plantas. En *Arabidopsis*, los niveles crecientes de fosfato inorgánico (Pi) estimulan la elongación de la raíz principal, pero hacen disminuir la densidad de las raíces laterales e inhiben su elongación (Linkohr y col., 2002). Por el contrario, los niveles bajos a moderados de Pi favorecen el desarrollo de las raíces laterales por sobre el de la principal (Williamson y col., 2001). Ante niveles de Pi excesivamente bajos, la densidad de las raíces laterales puede aumentar hasta cinco veces, junto con una represión severa del crecimiento de la raíz principal (López-Bucio y col., 2002). La respuesta fisiológica a las bajas concentraciones de Pi se debe al cese de la actividad de las células meristemáticas y a la pérdida de la respuesta a las auxinas en el ápice radicular (López-Bucio y col., 2003). De hecho, el rol de las auxinas en la respuesta a la falta de Pi sigue siendo controvertido (Linkohr y col., 2002; Hardtke, 2006). El estudio de varias líneas mutantes de *Arabidopsis* permitió demostrar que la concentración interna de Pi es determinante para la formación de las raíces (Williamson y col., 2001). Ante la falta de Pi, las plantas de *Arabidopsis* mutantes *phr1* tienen una relación de crecimiento alterada entre el tallo y la raíz. El gen *PHR1* (del inglés, *PHOSPHATE RESPONSE REGULATOR 1*) codifica un FT de la familia MYB, que se une a los promotores de genes inducidos por la falta de Pi (Rubio y col., 2001). Se ha sugerido que *PHR1* define una vía de señalización de respuesta a la falta de Pi, conjuntamente con *PHO2* (que codifica una enzima involucrada en el metabolismo del Pi) y el microARN *miR-399* (Bari y col., 2006). El *miR-399* se induce por la falta de Pi y su expresión constitutiva reprime la transcripción de *PHO2*, hecho que resulta en la

acumulación de Pi en las hojas (Fujii y col., 2005; Chiou y col., 2006). A su vez, las altas concentraciones de Pi inhiben la expresión del *miR-399* y estabilizan los niveles de transcritos de *PHO2*, gen cuyo producto actuaría corriente debajo del FT PHR1. Aparentemente, esta vía de señalización estaría evolutivamente conservada en las plantas vasculares (Osmont y col., 2007).

El efecto del estrés abiótico en la modulación del sistema radicular

En términos generales, los factores abióticos afectan la arquitectura y el crecimiento de las raíces (Dinny y col., 2008). Por ejemplo, se sabe que la luz es un regulador positivo de la ramificación radicular y que a su vez limita la formación de raíces adventicias (Cluis y col., 2004; Sorin y col., 2005). Las condiciones adversas tales como el estrés hídrico o salino inducen la producción de hormonas específicas que permitan la supervivencia (Wolters y Jürgens, 2009). A modo de ejemplo, en un estudio en el que se evaluó la formación de las raíces laterales en función de la disponibilidad de agua, se concluyó que la emergencia del primordio de las raíces laterales está reprimida en condiciones de déficit hídrico. Esta respuesta es dependiente de la acción del ABA y del gen *LATERAL ROOT DEVELOPMENT 2* (Deak y Malamy, 2005). Se sabe también que las altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en el suelo inducen la síntesis de ABA e inhiben la ramificación y el normal crecimiento de las raíces (Osmont y col., 2007). La alta salinidad dificulta la absorción del agua, daña la fisiología celular y enlentece el crecimiento (Apse y col., 1999; Zhu, 2002; Achard y col., 2006). Los efectos adversos causados por las altas concentraciones salinas motivan la poca proliferación vegetal en muchos desiertos del mundo, incluidas algunas regiones del norte argentino.

El control del ambiente sobre el crecimiento de las raíces está mediado por la acción de las fitohormonas ABA y etileno. Sin embargo, un balance coordinado por la señalización cruzada con otras hormonas como las auxinas, las giberelinas y las citoquininas es esencial para que la planta sobreviva a las condiciones adversas.

El rol de las hormonas en el sistema radicular

Las fitohormonas no sólo ejercen un control intrínseco de la determinación del sistema radicular, sino que también participan en la adaptación del desarrollo a las condiciones ambientales en constante cambio. Como se mencionó más arriba, la habilidad de adaptación de las plantas depende de la integración entre el programa intrínseco de desarrollo y la correcta percepción del medio circundante. Para alcanzar un desarrollo balanceado es muy importante que se produzca una interrelación entre las vías de síntesis y las de señalización de las diferentes fitohormonas. Por ejemplo, la síntesis del ABA y del etileno se induce por el estrés salino (Achard y col., 2006; Huang y col., 2008). La inhibición de la elongación de la raíz que ejercen ambas hormonas es la consecuencia de la reducción en los niveles de giberelinas y la estabilización de las proteínas DELLA. Estas proteínas son, a su vez, degradadas en respuesta a las auxinas, y podrían mediar un mecanismo general de la modulación del crecimiento de la planta en respuesta al estrés (Figura I.6; Achard y col., 2006; Wolters y Jürgens, 2009).

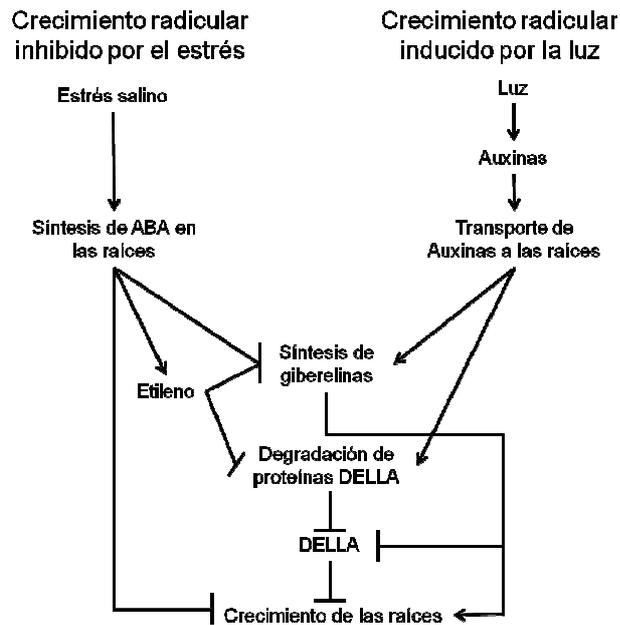


Figura I.6. La modulación del crecimiento radicular por el estrés salino y la luz. La respuesta depende de los tejidos y del contexto de desarrollo. Las puntas de flecha indican inducción y las puntas planas indican represión. Adaptado de Wolters y Jürgens (2009).

Los avances científicos de los últimos años han demostrado que el ambiente tiene un impacto directo en los niveles de las hormonas en los órganos, y que la influencia en la homeostasis hormonal de la planta puede desencadenar una rápida adaptación al medio (Fu y Harberd, 2003; Achard y col., 2006; Carabelli y col., 2007; Stepanova y col., 2008).

Las auxinas

De las hormonas clasificadas como auxinas, el ácido indol-3-butírico promueve eficientemente la formación de las raíces adventicias y es usado comúnmente en horticultura. Sin embargo, el ácido indol-acético (IAA) es el más abundante y aparentemente el más importante en la determinación del sistema radicular; cuando es aplicado en forma exógena induce la formación de las raíces laterales (Laskowski y col., 1995 y 2006). Las auxinas son de vital importancia en todas y cada una de las etapas de la formación de las raíces laterales: iniciación, determinación de su patrón, emergencia y crecimiento (Péret y col., 2009 a y b). El lugar preciso de la iniciación de la raíz lateral es probablemente una consecuencia del transporte de las auxinas y no de su síntesis *de novo*, aunque aún se desconoce qué es lo que determina cuándo y dónde se formará una raíz lateral a lo largo de la principal (Aloni y col., 2006). Existen diferentes estudios genéticos que aportaron información que confirma el rol predominante de las auxinas en la formación de las raíces laterales. En este sentido, las plantas transgénicas o mutantes con una elevada síntesis de auxinas muestran un incremento significativo en la ramificación radicular (Boerjan y col., 1995; King y col., 1995). De manera acorde, las plantas mutantes con niveles bajos de auxinas (Celenza y col., 1995) tienen un

sistema radicular corto y poco ramificado, lo que confirma también la importancia de las auxinas en el crecimiento de la raíz principal. Las plantas mutantes con las vías de señalización alteradas muestran defectos en la iniciación o en etapas avanzadas de la formación de las raíces laterales (Fukaki y col., 2002; Tatematsu y col., 2004; Ivanchenko y col., 2006). Además, las mutantes afectadas en el transporte polar de las auxinas muestran un desarrollo deficiente de las raíces laterales (Hobbie y Estelle, 1995). Los FTs de la familia ARF (del inglés, AXIN RESPONSE FACTORS) son actores claves en la señalización de las auxinas en la formación de las raíces laterales (Péret y col., 2009b). A su vez, se sabe que los ARFs regulan en forma directa a los FTs de tipo LOB (del inglés, LATERAL ORGAN BOUNDARIES; Okushima y col., 2005), que forman una familia recientemente identificada y caracterizada por la presencia de un dominio de unión a ADN que sólo existe en el reino vegetal. Ahora se conoce a estos FTs como LBDs (del inglés, LOB DOMAIN). Los FTs de la familia LBD están involucrados en la formación de raíces laterales y adventicias en cereales (Liu y col., 2005). En *Arabidopsis*, participan en la iniciación de las raíces laterales y en su formación hasta antes de la emergencia (Okushima y col., 2005; Lee y col., 2009; Péret y col., 2009b). Cabe destacar que los genes homólogos de la familia LBD de distintas especies vegetales participan en procesos diferentes, como en la formación de raíces laterales en plantas dicotiledóneas y en la de las adventicias en las monocotiledóneas (Hochholdinger y Zimmermann, 2008).

Las citoquininas

Las citoquininas son una clase de hormonas derivadas de la adenina y cumplen roles muy diversos a lo largo de la vida de la planta, tanto en las raíces como en su parte aérea (Müller y Sheen, 2008). Contrariamente al efecto de las auxinas, la aplicación exógena de citoquininas reprime la formación de las raíces laterales. Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* con bajos niveles de citoquininas muestran una raíz principal más larga y más ramificada (Werner y col. 2003). El rol de las citoquininas en los meristemas del tallo y de la raíz tiene características opuestas. Aparentemente, el antagonismo general entre las auxinas y las citoquininas es apreciable en la ramificación de las raíces (Cluis y col., 2004). La noción de que las citoquininas regulan negativamente el crecimiento radicular ha sido verificada mediante los estudios de mutantes afectadas en su señalización. Por ejemplo, las líneas de *Arabidopsis* doblemente mutantes en los receptores AHK2 y 3 (del inglés, HISTIDINE KINASE) sufren un crecimiento acelerado de la raíz principal y una ramificación mayor (Riefler y col., 2006). Los receptores de citoquininas del tipo HK han sido caracterizados también mediante estudios genéticos en las plantas modelo de leguminosas *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* (González-Rizzo y col., 2006; Murray y col., 2007; Trichine y col., 2007). En ambos casos se descubrió que tanto MtCRE1 (del inglés, CYTOKININ RECEPTOR) como LHK1 son esenciales para la formación de los nódulos simbióticos, poniendo de manifiesto la importancia de las citoquininas en el desarrollo de un órgano propio de las leguminosas. El rol de las citoquininas en la formación de los nódulos será abordado más extensamente en el Capítulo 2.

El etileno

El etileno es un alcano gaseoso que ejerce funciones hormonales en las plantas. Se cree que el etileno media ciertas respuestas inducidas por las auxinas, ya que varias plantas mutantes afectadas en la señalización de las auxinas son también insensibles al etileno. Además, la expresión de la ACC sintasa, una enzima limitante en la biosíntesis de etileno, es inducible por las auxinas (Swarup y col., 2002). De hecho, las concentraciones moderadas de etileno inhiben el crecimiento de la raíz, probablemente alterando el mantenimiento del centro quiescente y de la caliptra, tanto en maíz como en *Arabidopsis* (Ponce y col., 2005). Las plantas mutantes que no muestran esta respuesta (Stepanova y col., 2005) también presentan un nivel inferior de auxinas en la raíz y pueden reprimir el efecto de súper ramificación que tienen las plantas que producen un exceso de auxinas. Esto sugiere no sólo que las auxinas controlan la homeostasis de etileno, sino que el control es mutuo. Sin embargo, este efecto podría deberse a un transporte defectuoso de las auxinas del tallo a la raíz. Por último, el etileno parecería jugar un rol en la emergencia de las raíces laterales rompiendo las células corticales (Laskowski y col., 2006).

Las giberelinas

La síntesis del ácido giberélico ha sido detectada en el ápice de las raíces de diferentes especies, y se requiere de la señalización de las giberelinas y de su modulación por las auxinas para el crecimiento radicular (Kaneko y col., 2003; Fu y Harberd, 2003; Ubeda-Tomas y col., 2009). Las giberelinas actúan sinérgicamente con el etileno en la promoción de la formación de las raíces adventicias en las plantas de arroz en condiciones de inundación (Steffens y col., 2006).

Los brasinoesteroides

Estas hormonas son muy abundantes en el tallo, pero también han sido detectadas en concentraciones considerables en las raíces de maíz y de tomate, e incluso se cree que podrían ser sintetizadas *in situ* (Yokota y col., 2001; Kim y col., 2006). Al igual que las auxinas, los brasinoesteroides inducen el crecimiento radicular en bajas concentraciones, y lo inhiben en altas (Mussig y col., 2003). También se ha propuesto que los brasinoesteroides regularían el transporte de las auxinas durante la formación de las raíces laterales (Bao y col., 2004). Algunas evidencias indican además, que existe cierta interdependencia entre las vías de señalización de ambas hormonas (Goda y col., 2002; Mussig y col., 2003; Nemhauser y col., 2004; Mouchel y col., 2006).

El ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un isoprenoide que recibió su nombre por el rol que juega en la abscisión de las hojas. El ABA se produce en todos los órganos de la planta, y especialmente en las raíces en respuesta al exceso de calor, la alta salinidad del suelo o la falta de agua. El ABA es considerado la hormona del estrés por excelencia (Zhu, 2002; Sharp, 2002; Shinozaki y col., 2003; Mauch-Mani y col., 2005; Verslues y Zhu, 2005) y juega un rol central en la plasticidad del desarrollo. Sin embargo, también ejerce funciones regulatorias en condiciones normales (Cheng y col., 2002; De Smet y

col., 2006; Ding y col., 2008). El ABA es reclutado como una señal interna para muchos procesos del desarrollo, incluyendo la dormición y maduración de la semilla, la determinación de la forma de la hoja, el crecimiento de la raíz y la senescencia (De Smet y col., 2006). Recién en los últimos años se ha relacionado al ABA en la inhibición del crecimiento de la raíz principal y de las laterales (Hunter y col., 2004). La acción del ABA en la formación de las raíces laterales es dependiente de la disponibilidad de nutrientes (Signora y col., 2001) y el estrés osmótico producido por la salinidad o la sequía. De esta manera, el ABA es capaz de reprimir la formación de la raíz lateral en todas sus etapas como respuesta al contorno estresante. Si bien el ABA bloquea la acción de las auxinas en este proceso, se desconocen los mecanismos moleculares puestos en juego (Figura I.7; De Smet y col., 2006). El ABA, a su vez, está encargado de la activación del meristema de la raíz lateral luego de la emergencia (De Smet y col., 2003). El comportamiento de ABI3 (del inglés, ABA INSENSITIVE), un FT inducido por auxinas, en la regulación de genes de respuesta a auxinas y ABA sugiere que existe una interrelación compleja entre las vías de señalización de ambas hormonas (Brady y col., 2003).

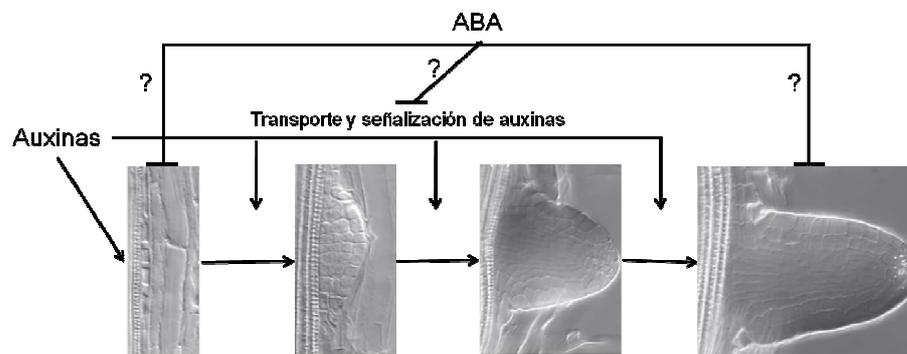


Figura I.7. Control del ABA y las Auxinas sobre la formación de las raíces laterales. El ABA inhibe la iniciación y emergencia de las raíces laterales, así como interfiere en la señalización de las auxinas. Adaptado de De Smet y col. (2006).

Vale mencionar que tanto en *Medicago truncatula* como en arroz, las bajas concentraciones de ABA estimulan la formación de las raíces laterales (Chen y col., 2006; Liang y col., 2007). Se deben aplicar concentraciones mayores en forma exógena para semejar el efecto del estrés en la formación de las raíces laterales.

La modulación del sistema radicular por los factores bióticos

No sólo el estrés abiótico afecta el sistema radicular sino también una variedad de factores de origen biológico. En la naturaleza las plantas están en contacto con microorganismos saprófitos y patógenos que afectan drásticamente el sistema de las raíces. Por ejemplo, la infección de plantas de petunia con *Ralstonia solanacearum* produce una inhibición de la elongación de las raíces laterales y al mismo tiempo una inducción de la formación de nuevas raíces laterales anormales (Zolobowska y Van Gijsegem, 2006). Sin embargo, son las interacciones simbióticas las que gobiernan más frecuentemente los cambios en el sistema radicular. Desafortunadamente, en el modelo vegetal mejor estudiado y caracterizado, *Arabidopsis thaliana*, no se establece ninguna

relación simbiótica en sus raíces y, por ende, esta planta no puede ser utilizada como modelo del impacto que tiene esta interacción en el sistema radicular. Éste es uno de los motivos más importantes que indican la necesidad de considerar otros modelos de estudio que contemplen eventos del desarrollo fundamentales para la biología vegetal de gran impacto en la agricultura.

La interacción con las micorrizas

A diferencia de *Arabidopsis*, más del 80 % de las plantas vasculares se asocian con hongos como las micorrizas, que causan grandes cambios en la morfología de las raíces de la planta huésped (Hetrick, 1991). La represión de la elongación de las raíces por la interacción con las micorrizas depende tanto de la especie vegetal como de la fúngica. Una vez que el hongo está establecido, la ramificación de la raíz se ve inhibida, lo que hace a la planta más dependiente de los nutrientes provistos por el hongo (Price y col., 1989; Hetrick, 1991). No está claro aún si el cambio en el sistema radicular es una consecuencia directa de la simbiosis con el hongo o un efecto indirecto por la mejora en la disponibilidad de nutrientes ofrecida por éste. Por otro lado, está claro que los hongos simbiosis tienen la capacidad de inducir la iniciación de las raíces laterales (Harrison, 2005). Cabe destacar que muchos microorganismos que interactúan con las plantas pueden producir compuestos análogos a las fitohormonas. La modulación de la homeostasis hormonal durante la simbiosis es fundamental para desencadenar un cambio en la arquitectura y crecimiento de las raíces (De Billy y col., 2003; Lohar y col., 2004).

La interacción con bacterias: la formación de los nódulos simbióticos

El segundo caso más importante de simbiosis en las raíces de las plantas es el de la asociación de las leguminosas con bacterias fijadoras de N, para dar lugar a la formación de un nuevo órgano: el nódulo simbiótico. A continuación describiremos a las plantas leguminosas y en particular el proceso de nodulación.

La familia de las plantas leguminosas y el proceso de nodulación

Las **fabáceas** (*Fabaceae*) o **leguminosas** (*Leguminosae*) son una familia de árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto de tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. Con cerca de 700 géneros, entre los que hay aproximadamente 18.000 especies diferentes, las leguminosas conforman la tercera familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas (*Asteraceae*) y las orquídeas (*Orchidaceae*; Graham y Vance, 2003; Pajuelo y Stougaard, 2005). Si el reino vegetal fuera el pueblo de Macondo, seguramente las leguminosas llevarían el apellido Buendía¹, pues varios integrantes de esta familia protagonizaron desde descubrimientos que marcaron un hito en la historia de la ciencia, hasta escándalos

¹ La metáfora se refiere a la familia de José Arcadio Buendía, de la célebre novela “Cien años de soledad” (1967), del escritor colombiano Gabriel García Márquez, ganador del Premio Nobel de Literatura en el año 1982.

político-sociales de gran magnitud. Por ejemplo, la arveja (*Pisum sativum*) fue el objeto de estudio de Gregor Mendel (1865, Figura I.8) que sirvió para describir las bases de la herencia genética. Más recientemente, los intereses en torno a la renta de la soja (*Glycine max*) desataron un conflicto sin precedentes en el escenario político-económico de nuestro país. Otro integrante destacado es el ceibo (*Erythrina crista-galli*), flor nacional de Argentina y Uruguay. Además, otras especies de leguminosas son los árboles nacionales de Brasil (*Caesalpinia echinata*), Costa Rica (*Enterolobium cyclocarpum*) y Australia (*Acacia pycnantha*), por ejemplo.



Figura I.8. Dibujo de las diferentes estructuras de la planta de arveja (*Pisum sativum*) realizado por el biólogo alemán Otto Wilhelm Thomé (1885).

Como decíamos, las leguminosas pertenecen a una familia grande y diversa que incluye varias especies de interés agrícola. Durante miles de años, las leguminosas han sido utilizadas como alimento por los seres humanos. La lenteja, por ejemplo, fue probablemente una de las primeras especies en ser domesticadas. En general, sus granos son muy ricos en proteínas, carbohidratos y fibras, mientras que el contenido en lípidos es relativamente bajo y los ácidos grasos que los componen son insaturados. Una excepción a esta regla es la soja, que tiene un alto contenido en lípidos. Otras leguminosas de interés alimenticio son el maní (*Arachis hypogaea*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*) y el garbanzo (*Cicer arietinum*), entre otras. Los frutos de los algarrobos (*Prosopis alba* y *Prosopis nigra*) se usan en el noroeste argentino para elaborar dos bebidas, frescas y fermentadas. También su madera es aprovechada para la fabricación de muebles. Algunas de las especies de leguminosas utilizadas como forrajeras son la alfalfa (*Medicago sativa*), la lupulina (*Medicago lupulina*) y los tréboles (por ejemplo, *Medicago hispida*, *Medicago arabica* y *Medicago minima*). Una de las principales limitaciones para el establecimiento y producción de las praderas de leguminosas anuales es la baja fertilidad de los suelos y, en particular, el bajo contenido de fósforo de los mismos. Es de destacar que la inclusión de estas plantas como cultivo

de descanso en las rotaciones anuales permite reducir la necesidad de control químico de plagas y patógenos. Esto se debe a que producen una amplia gama de productos naturales complejos, que estarían participando en el establecimiento de la simbiosis y la protección de las plantas de distintos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico. Estas características hacen que las leguminosas sean un blanco atractivo para la investigación genómica funcional (Panter y col., 2000).

Las leguminosas pueden fijar el N_2 atmosférico en el suelo al hacer simbiosis con la clase de bacterias rhizobia, lo que reduce la necesidad de aplicación de fertilizantes nitrogenados (Panter y col., 2000). Los análisis filogenéticos basados en la secuencia nucleotídica del gen *RBCL* ubican a todas las plantas involucradas en la simbiosis con rhizobia o actinorhiza en la misma clase. Esto indica que la predisposición a la nodulación evolucionó sólo una vez (Soltis y col., 1995; Doyle, 1998). Sin embargo, varios tipos de nódulos muestran diferencias morfológicas y bioquímicas, lo que destaca que existieron múltiples orígenes de nodulación, incluso dentro de la familia de las leguminosas (Doyle, 1998; Doyle y Luckow, 2003).

La nodulación es una simbiosis específica entre las leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno que permite el crecimiento de la planta en suelos con poco nitrógeno (Oka-Kira y Kawaguchi, 2006; Oldroyd y Downie, 2008). Durante esta interacción, las bacterias invaden la raíz y son contenidas en compartimientos intracelulares dentro de órganos especializados, los nódulos (Figura I.9). Una vez en los mismos, transforman el N_2 atmosférico en NH_3 , el que puede ser utilizado por la planta como fuente de nitrógeno (Oldroyd y Downie, 2008).

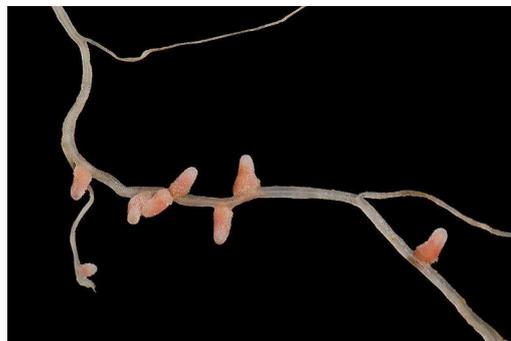


Figura I.9. Raíz de *Medicago truncatula* ecotipo A17 de 4 semanas de edad inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*. Tomada de:

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medicago_truncatula_A17_root_nodules.JPG

Los compuestos flavonoides e isoflavonoides que se producen en las leguminosas inician el intercambio de señales que da origen a la nodulación (Subramanian y col., 2007). La bacteria reconoce esta señal específica y responde produciendo lipo-quitto-oligosacáridos, compuestos que difieren entre sí en la naturaleza de la cadena de ácidos grasos, en el número de residuos de N-acetilglucosamina y en las sustituciones en los azúcares (Goormachtig y col., 2004). Estos compuestos son conocidos como factores de nodulación (factores Nod) y actúan como fitohormonas difundiendo en las raíces para activar diversos procesos de desarrollo (Oldroyd y Downie, 2008). La nodulación comienza con la deformación de los pelos radiculares, la oscilación de calcio intracelular y la despolarización de la membrana. Esto conduce a la

inducción de genes específicos durante las primeras etapas de la nodulación y que dan lugar a la división de las células corticales. Así se inicia un programa organogénico en la planta que conduce al desarrollo del nódulo, mediante el establecimiento de un meristema y un primordio nodular (Catoira y col., 2000; Gage, 2004). En el Capítulo 2 se describirá en forma detallada la regulación génica del proceso de nodulación, y especialmente el rol que ejercen las hormonas citoquininas.

La importancia de esta familia de plantas desde distintos puntos de vista, incluyendo sus usos, justifica el esfuerzo de buscar una o varias especies modelo. En este sentido, la formación de consorcios internacionales ha favorecido el avance en la secuenciación de genomas de leguminosas. Hasta el momento se ha completado la descripción de la secuencia de los genomas de *Lotus japonicus* y *Glycine max*; la de *Medicago truncatula* está cerca de ser finalizada y se avanza en el conocimiento de los de *Pisum sativum* y *Phaseolus vulgaris*, entre otras especies.

***Medicago truncatula* como modelo del proceso de nodulación y del sistema radicular**

Con el objeto de facilitar los estudios moleculares y genéticos en leguminosas, se han elegido principalmente dos sistemas modelos: *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* (Oldroyd y Geurts, 2001; Udvardi y col., 2005). Ambas especies poseen todas las características esenciales que deben cumplir las plantas modelos, tales como un tiempo de generación relativamente corto, un genoma diploide pequeño, autopolinización, y un sistema de transformación eficiente (Smit y Bisseling, 2008). El tamaño del genoma de *Medicago* es cercano a las 500 Mbp, y se encuentra dividido en ocho cromosomas. Esto lo hace aproximadamente cuatro veces más grande que el genoma de *Arabidopsis*, y de una longitud similar al de arroz (Smit y Bisseling, 2008).

Aunque estas dos especies pertenecen a la misma subfamilia *Papilionoideae* y son plantas que se encuentran muy relacionadas, presentan diferentes propiedades simbióticas. Los nódulos de *Medicago* tienen un meristema persistente que provee un crecimiento indeterminado, y son generados por *Sinorhizobium meliloti*; mientras que los producidos por *Lotus* son determinados, cesando su actividad meristemática en una etapa temprana del desarrollo, y se generan al interactuar con *Mesorhizobium loti* (Smit y Bisseling, 2008).

Por otro lado, gracias a la genómica funcional sobre *M. truncatula* se han generado más de 225.000 etiquetas de secuencia expresadas (del inglés ESTs, por *Expressed Sequence Tags*), las que han sido ensambladas en aproximadamente 18.600 secuencias consenso. Estos datos, junto con la secuencia parcial del genoma, se utilizaron para construir microarreglos basados en ADNc y oligonucleótidos. Asimismo, con el genoma de *S. meliloti* completamente secuenciado, se desarrollaron microarreglos duales que permiten determinar el perfil del transcriptoma de ambos simbiontes (Smit y Bisseling, 2008).

Existen procesos de desarrollo y de interacción que pueden ser estudiados en *Arabidopsis*. Sin embargo y dadas las características particulares de las leguminosas, se considera más adecuado llevar a cabo las investigaciones en *M. truncatula*. Entre esas características están su ciclo de vida y su morfología, el espectro de patógenos y plagas que la infectan y las vías bioquímicas específicas en el metabolismo de las leguminosas. Algunos ejemplos de estos procesos que han motivado investigaciones recientes en

Medicago incluyen al desarrollo de semillas, vainas y flores (Wang y Grusak, 2005; Moreau y col., 2006), y la fisiología e intercambio de nutrientes del nódulo (Carvalho y col., 2003).

Con respecto a la fisiología de su parte aérea, una planta de *M. truncatula* se compone de: 1) un eje principal que se puede organizar en una roseta o como un eje alargado, y 2) ramificaciones de diferentes órdenes (por ejemplo, ramificación primaria, secundaria o terciaria). Su morfología vegetal y arquitectura varían según el genotipo, y son muy dependientes de las condiciones ambientales y de cultivo (Moreau, 2006).

Cada eje de la planta se compone de un fitómero. El mismo es la unidad básica de desarrollo que, para *M. truncatula*, se compone de (véase Figura I.10):

- Un entrenudo (sección del tallo entre dos nodos adyacentes);
- Una hoja: a excepción de la primera hoja verdadera que es unifoliada, las hojas de las plantas de *Medicago* son trifoliadas. Cada hoja se compone de un pecíolo, de un aserrado tridentado ubicado en su parte superior, y dos estípulas basales (excrecencias crecidas a ambos lados de la base del pecíolo), cuya función es proteger a la yema axilar;
- Un meristema axilar, susceptible de producir ramas o los órganos reproductivos (Moreau, 2006).

Durante el desarrollo de la planta, los fitómeros se producen sucesivamente desde el meristema apical del tallo, quedando apilados de forma tal que los más antiguos se encuentran en la base y los más jóvenes en el extremo superior del tallo (Moreau, 2006).

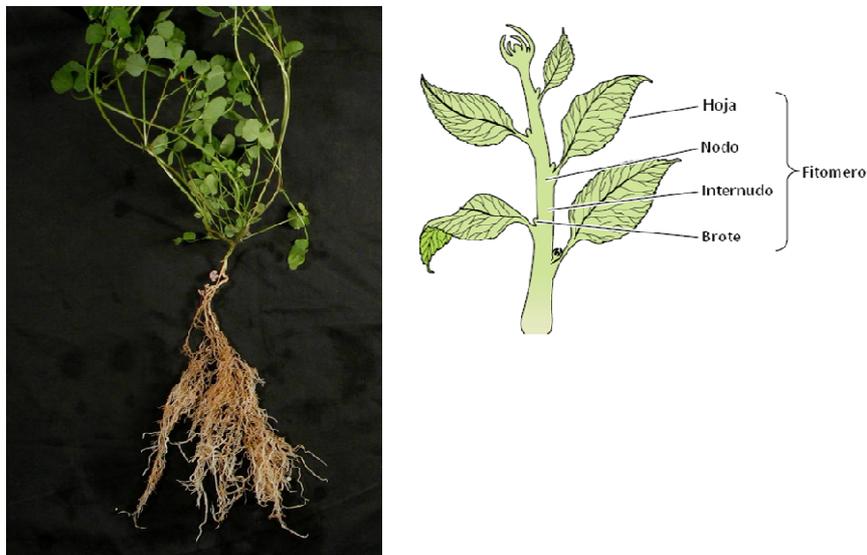


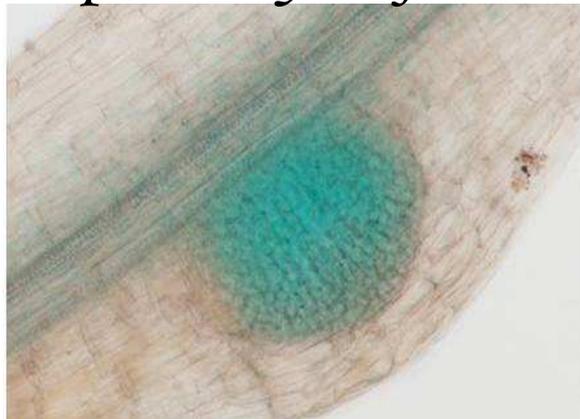
Figura I.10. Esquema de una planta de *Medicago truncatula*. A) Imagen de una planta de *Medicago truncatula*. B) Representación esquemática de un fitómero en el que se señalan los distintos elementos que lo conforman. Adaptado de Taiz L y Zeiger E (2006).

La regulación de la expresión génica en las raíces de las leguminosas

En los últimos años se ha identificado en diferentes especies un número muy grande de FTs involucrados en la señalización de las fitohormonas y en la formación de

las raíces en particular (Montiel y col., 2004; Benfey, 2005; Hardtke, 2006). En lo que respecta a las leguminosas, también se han llevado a cabo estudios transcripcionales con el fin de identificar FTs involucrados potencialmente en el desarrollo y la respuesta al ambiente (Udvardi y col., 2007). Sin embargo, aún son muy pocos los casos en los que se han realizado estudios genéticos que contribuyan a dilucidar su función (Hofer y col., 2009). En los últimos tiempos, también se han identificado diferentes ARN no codificantes transcritos preferencialmente en las raíces de *Arabidopsis* (Ben Amor y col., 2009) y *Medicago truncatula* (Lélandais y col., 2009), algunos de los cuales, además, están inducidos por diferentes tipos de estrés abiótico o interacciones bióticas. Esto indica que la regulación de la expresión génica en las raíces es sumamente compleja e involucra controles a nivel epigenético, transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. La dilucidación de más mecanismos moleculares que intervienen en la determinación del sistema radicular ayudará a comprender de qué manera las plantas son capaces de adaptar su desarrollo en función del medio circundante.

Hipótesis y Objetivos



*“... quién dijo que todo está perdido,
yo vengo a ofrecer mi corazón...”*

(Fito Páez)

Hipótesis y Objetivos

Sabemos que el ambiente ejerce una presión adaptativa sobre las raíces de las plantas, y en particular de las leguminosas. Dicha adaptación está gobernada por la acción de las fitohormonas que regulan la actividad de los factores de transcripción a diferentes niveles, desencadenando respuestas coordinadas de desarrollo. El objetivo de este trabajo de Tesis se focaliza en la caracterización funcional y bioquímica de dos factores de transcripción que participan en la determinación del sistema radicular de *Medicago truncatula* en respuesta a las hormonas y en relación con el ambiente.

El primero de ellos está codificado por el gen *MtHB1*, perteneciente a la familia HD-Zip e identificado por estar inducido transcripcionalmente en respuesta al estrés salino (Gruber y col., 2009). De esto se desprende la hipótesis de que MtHB1 participa en la respuesta adaptativa de la raíz al estrés ambiental. Los objetivos particulares que se persiguieron con respecto a este gen son:

- Caracterizar su perfil de expresión en respuesta al estrés y al ABA.
- Determinar su patrón de expresión, analizando la actividad de su región promotora seguida del gen reportero *GUS*.
- Analizar el efecto de la expresión constitutiva del gen en raíces transgénicas de *M. truncatula*.
- Caracterizar el sistema radicular de dos líneas independientes de plantas mutantes *mthb1*.
- Expresar el dominio de unión a ADN en bacterias y determinar la secuencia blanco reconocida *in vitro*.
- Desarrollar una búsqueda bioinformática de genes regulados por el estrés salino que contengan la secuencia blanco de MtHB1 en sus regiones promotoras y que estén potencialmente regulados en forma directa por este factor de transcripción.
- Caracterizar el perfil y el patrón de expresión del/de los gen/es seleccionados, tanto en plantas salvajes como en las mutantes *mthb1*.
- Determinar la funcionalidad del elemento *cis* potencialmente reconocido por MtHB1 en el promotor del gen blanco, y validar fehacientemente la interacción molecular directa entre el factor de transcripción y su gen blanco.

El segundo de ellos está codificado por el gen *MtRR1*, perteneciente a la familia RR de Tipo B, cuyos miembros están activados post-traduccionalmente por un receptor específico de las hormonas citoquininas. Además, diferentes estudios han demostrado que la actividad de estos receptores es crucial para la formación de los nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno en las raíces de las leguminosas (González-Rizzo y col., 2006; Murray y col., 2007). Se sabe que la transcripción *MtRR1* está especialmente enriquecida en estos órganos, por lo que se desprende la hipótesis de que este gen juega un papel en relación existente entre las hormonas citoquininas y la organogénesis de los

nódulos de *M. truncatula*. Los objetivos particulares que se persiguieron relativos a este gen son:

- Desarrollar un ensayo de microarreglos que permita identificar a los genes diferencialmente expresados en el ápice de las raíces en respuesta a un tratamiento con citoquininas exógenas (BAP 10^{-7} M, 1 h).
- Definir los procesos metabólicos y las familias de enzimas regulados en respuesta al tratamiento.
- Expresar el dominio MYB de unión a ADN de MtRR1 de forma soluble en bacterias.
- Llevar a cabo una selección asistida por PCR del núcleo de ADN reconocido por MtRR1 *in vitro* (SELEX; Oliphant y col., 1989).
- Analizar el promotor del único gen de la familia RR de Tipo A conocido en *M. truncatula* (típicamente regulados por los de Tipo B), en búsqueda de elementos *cis* similares al consenso obtenido por SELEX.
- Desarrollar una búsqueda bioinformática de genes regulados por citoquininas que contengan la secuencia blanco de MtRR1 en sus regiones promotoras y que estén potencialmente regulados en forma directa por este factor de transcripción.
- Caracterizar la actividad de los elementos *cis* putativos en respuesta a las citoquininas mediante la obtención de extractos proteicos nucleares y ensayos de retardo en geles.
- Validar la funcionalidad de los elementos *cis* en los promotores de algunos de los genes identificados que estén ligados a la nodulación, tanto en respuesta al tratamiento con citoquininas exógenas, como durante la formación de los nódulos simbióticos.

Materiales y Métodos



*“... no te salves,
no te llenes de calma...”
(Mario Benedetti)*

Materiales y Métodos

Material biológico

El objeto de estudio de este trabajo es la planta *Medicago truncatula* cv. Jemalong A17, así como las líneas mutantes *mthb1-1* y *-2* y *mtcre1-1* identificadas por TILLING (Le Signor y col., 2009). Las mutaciones de las líneas *mthb1-1* y *-2* están indicadas en la Figura 1.1 del Capítulo 1, y la correspondiente a la línea *mtcre1-1* presenta un codón de terminación en la posición 573 de la proteína, truncando el dominio kinasa (Plet y Frugier, resultados no publicados). En todas las comparaciones fenotípicas se utilizaron como controles las plantas salvajes obtenidas de la segregación de las mutantes. En todos los casos, las semillas se escarifican mediante el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 3 min. Luego del lavado con abundante agua, las semillas se esterilizaron durante 20 min con hipoclorito de sodio 12% [v/v]. Finalmente, se lavaron con abundante agua estéril antes de disponerlas espaciadamente en placas de Petri con agar al 1 %. Las placas se incubaron a 4 °C durante 2 días y luego 16 h a 24 °C, siempre en la oscuridad. Sólo las plántulas que germinaron se traspasaron a placas cuadradas (12 cm de lado) que contenían medio agarizado “i” (Blondon, 1964) o Fahræus (Truchet y col., 1985), según correspondiera, de manera adecuada para el crecimiento vertical en cámaras de cultivo a 24 °C, en condiciones de día largo (16 h de luz, con una intensidad lumínica de 150 µE, y 8 h de oscuridad). Para los ensayos de nodulación, las plántulas se cultivaron *in vitro* en un medio pobre en nitrógeno (medio “i”). La inoculación de las raíces se hizo con 10 ml por placa de una suspensión de Sm1021 *Sinorhizobium meliloti* (OD₆₀₀ = 0.05) durante 1 h.

Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se hicieron en la solución amortiguadora provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u y 0,1 µM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó una dilución apropiada del ADN molde y luego se le agregaron 0,3 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) o la misma cantidad de unidades de

Pfu ADN polimerasa (Fermentas) por cada 10 µl de volumen de reacción. En los casos en los cuales se utilizó *Pfu*, el MgCl₂ fue remplazado por MgSO₄ en la misma concentración. Los volúmenes de reacción fueron de 25 o 50 µl. Finalmente se añadió una gota de aceite mineral y se procedió con la reacción de amplificación según los objetivos del experimento.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) y en general se utilizó el siguiente programa, en el cual la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo: $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) - 5^\circ C$.

Programa: (1 min a 94 °C, 1,5 min a T_m, 1-3 min a 72 °C*) 30 ciclos + 10 min a 72 °C.

* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue *Pfu* (la cual presenta prueba de error) el tiempo es de 2 min por cada 1000 pb.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos ADN en geles de agarosa se empleó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 1987). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2 % (p/v), según el tamaño de los fragmentos que se deseaban separar. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x con una concentración de 0,3 µg/ml de bromuro de etidio. A cada muestra se le agregó 1/10 vol. de solución de siembra. La separación electroforética se llevó a cabo en solución TAE 1 x, empleando voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización del ADN en el gel se empleó un transiluminador de luz UV *UV/White Dark Room (UVP laboratory products)*. El registro de las imágenes de los geles se llevó a cabo empleando el sistema de captura de imágenes *UVP Lab. Prod.*

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó como marcador de tamaño molecular una muestra de ADN del bacteriófago λ digerido previamente con la enzima *HindIII*. Esta digestión genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Cuando el objetivo de la electroforesis fue el de purificar un fragmento, la corrida se llevó a cabo en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua bidestilada en un baño de agua a 65 °C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo, todas seguidas de una centrifugación de 10 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente a fin de separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 vol. de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o que se encontraban en baja cantidad, se adicionaron a la solución etanólica 2,5 µg de ARNt (Sigma). Tras la precipitación el fragmento purificado fue solubilizado en 13 µl de H₂O estéril.

En los casos en los que fue necesario obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

La purificación de los vectores binarios y de clonado, posterior al corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación alcohólica para evitar el daño mecánico.

Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 µl empleando el solución amortiguadora de reacción provista por el proveedor de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1. La incubación se realizó durante 16 h a 4 °C. En los casos en que se utilizó como vector de clonado el plásmido pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), se siguió el protocolo sugerido por el fabricante.

Transformación de bacterias

Electrotransformación de *E. coli*

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo *Gene Pulser™* (Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados.

Transformación de *Agrobacterium rhizogenes*

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio TY a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 2 h a 28 °C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio TY y se sembró en placas de Petri que contenían medio TY suplementado con los antibióticos

adecuados. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 h).

Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979). Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 min y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución I de minipreparación. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución II de minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente se agregaron 150 µl de KAc 3 M (pH 5,2) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 min antes de ser centrifugada a 13000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le realizó una extracción con fenol:cloroformo (1:1). El ADN plasmídico presente en la fase acuosa, fue precipitado mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -20 °C durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 70 % (v/v), luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente fue resuspendido en 30 µl de agua bidestilada estéril.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizado en las reacciones de determinación de secuencia y en la purificación de vectores de clonado y binarios, se realizaron empleando el equipo comercial *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de plásmido 100 ng/µl junto con 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM). Las muestras fueron procesadas por un secuenciador

automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados por correo electrónico.

Tratamientos con NaCl, manitol y hormonas

Para los estudios correspondientes al Capítulo 1, las plántulas de *M. truncatula* A17 salvajes o mutantes fueron transferidas 3 días luego de su germinación a placas cuadradas con medio Fahræus (Truchet y col., 1985, con agar 1,5 %) suplementado con NaCl, ABA, IAA (Sigma-Aldrich) o con combinaciones de estos reactivos en las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras. Luego de 6 días de tratamiento se analizó el fenotipo de las plantas. Para determinar el efecto de estos tratamientos en la regulación de la expresión génica a corto plazo, las semillas germinadas se transfirieron a cajas Magenta con 30 ml de medio líquido Fahræus, y se cultivaron en un agitador a 125 rpm, en condiciones de día largo a 24 °C. Luego de 7 días, las plántulas fueron tratadas con NaCl, manitol, ABA, IAA (Sigma-Aldrich) o combinación de ellos en idénticas condiciones durante 3 h. Luego se recolectaron las raíces y se las congeló rápidamente en nitrógeno líquido para proceder a la extracción de ARN.

Para evaluar el efecto del NaCl en el crecimiento de las raíces a largo plazo, las semillas ya germinadas fueron transferidas a macetas con una mezcla de arena:perlita (3:1, v/v) y regadas con medio Fahræus suplementado con NaCl en concentraciones de 0, 25, 50, 75 o 100 mM. Luego de 21 días, tanto el sistema radicular como la parte aérea de cada planta se secaron por separado y se pesaron individualmente. Para cada tratamiento se hicieron 3 replicados biológicos que contaron con al menos 20 plantas por genotipo y/o condición. Para determinar si las diferencias eran significativas entre al menos 3 condiciones y/o genotipos se aplicó un Test de Kruskal-Wallis (Georgin y Gouet, 2000; $P < 0,05$) o un Test de t de Student en el caso en que se compararon dos poblaciones.

Respecto a los ensayos con Benzyl-Amino-Purina (BAP, Sigma-Aldrich) descritos en el Capítulo 2, 15 semillas germinadas fueron transferidas a cajas Magenta con 30 ml de medio líquido “i”, y cultivadas en un agitador a 125 rpm, en condiciones de día largo a 24 °C. Luego de 5 días, las plántulas fueron tratadas con BAP en una concentración de 10^{-7} M en idénticas condiciones durante 0, 1 y 3 h. Cuando fue necesario, se llevó a cabo un pre tratamiento con cicloheximida (CHX, Sigma-Aldrich)

50 μ M. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se recolectaron las raíces y se las congeló rápidamente en nitrógeno líquido para proceder a la extracción de ARN.

Análisis de los niveles de transcritos por PCR en tiempo real

El ARN total de las raíces congeladas se extrajo con TRIZOL (Invitrogen) o usando el RNeasy plant mini kit (Qiagen). La síntesis de ADN copia se hizo a partir de 1,5 μ g de ARN total, usando el sistema Superscript II (Invitrogen). Para la cuantificación relativa de los niveles de ADN copia se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. Para ello, los oligonucleótidos utilizados para la amplificación (Tabla M.1) fueron diseñados con el programa Primer3 (disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/>). Las reacciones de amplificación fueron realizadas con el reactivo LightCycler 480 SYBR Green I Master kit, en un termociclador LightCycler 480, siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche). Los ciclos de la amplificación se desarrollaron de la siguiente manera: 10 min a 95 °C, 50 ciclos a 95 °C por 5 s, 58 °C por 5 s y 72 °C por 15 s. La especificidad de la amplificación fue verificada mediante una curva de disociación entre 55 y 95 °C. Se contempló un control negativo sin ADN copia para cada par de oligonucleótidos. En todos los casos, se consideraron 4 replicados biológicos independientes, con al menos 10 muestras en cada uno, además de un duplicado técnico proveniente de 2 síntesis independientes de ADN copia. Se llevó a cabo una normalización de los datos de las diferentes muestras midiendo los niveles de transcritos de los genes constitutivos *MtACTIN*, *MtRBPI* y *MtH3L*, seleccionados con el programa Genorm (disponible en <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; Vandesompele y col., 2002). Se eligió al gen *MtRBPI* (del inglés, RNA Binding Protein 1, Gruber y col., 2009) para el cálculo de las relaciones, y el valor del experimento en condiciones control fue tomado como 1, al establecer el valor de la expresión relativa o el factor de inducción.

Análisis del fenotipo de la arquitectura radicular

La determinación del número de raíces laterales iniciadas o emergidas se llevó a cabo mediante observación con el microscopio DMI6000B equipado con una cámara DFC 300 (Leica Microsystems). La iniciación de las raíces laterales se cuantificó por

inspección de todo el sistema radicular, desde la etapa de 4 células del primordio en adelante. Sólo se consideró a la raíz lateral como emergida si la capa de la epidermis se rompía. El porcentaje de raíces laterales emergidas se refiere a la relación entre las raíces laterales emergidas respecto a las iniciadas (100 %). Los resultados se expresaron como raíces iniciadas o emergidas por cm de la raíz principal (densidad), con el fin de independizar el resultado del efecto que pudiera tener una condición dada en la iniciación de las raíces laterales. Para el análisis del sistema radicular en condiciones simbióticas, las raíces fueron inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* como se describió más arriba, y el número de raíces laterales y nódulos por cm fue determinado a los 7, 11 y 16 días post inoculación (dpi). Cuando fue necesario, se utilizó el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para medir el largo de las raíces.

Transformación de raíces de *M. truncatula*

Para transformar la cepa bacteriana *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 (Sm^r, derivada de la cepa A4T; Quandt y col., 1993) se utilizaron las construcciones correspondientes obtenidas previamente en *E. coli*. Se transformaron las raíces de *M. truncatula* siguiendo la metodología sugerida por Boisson-Dernier y col. (2001). Las semillas se hicieron germinar como se describe más arriba y los ápices de las raíces de las semillas recién germinadas se cortaron con un bisturí antes de infectarlos con un cultivo crecido 48 h a 30 °C en medio sólido TY-agar de *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1. Las raíces transgénicas fueron seleccionadas después de transferirlas a un medio Fahræus suplementado con kanamicina (25 mg/l) y mantenidas durante 2 semanas en ese mismo medio. La primera semana de incubación la temperatura se mantuvo a 20 °C para favorecer la infección de la bacteria, mientras que durante la segunda se modificó a 24 °C. Luego las plántulas compuestas por una parte aérea salvaje y raíces transgénicas fueron transferidas al invernadero en una mezcla de arena y perlita o a placas con medio “i”-agar 1,5 % durante 4 días antes de someterlas a los distintos tratamientos.

Expresión constitutiva de *MtHB1* y *MtLBD1* en las raíces de *M. truncatula*

El ADN copia completo de *MtHB1* fue amplificado a partir de una muestra de ARN extraída de raíces tratadas con NaCl 100 mM durante 1 h, con los oligonucleótidos HB1 ADNc F y HB1 ADNc R (ver Tabla M.1). En el caso de *MtLBD1* se amplificó el gen completo a partir de un clon bacteriano de la biblioteca genómica de *M. truncatula*, con los oligonucleótidos LBD1 ADNc F y LBD1 ADNc R (Tabla M.1). Ambos amplicones fueron clonados en el vector binario pMF2 (que contiene el promotor 35S-CaMV; Merchan y col., 2007). Para obtener el grupo control de las raíces transformadas se utilizó el vector pMF2 vacío. Con el fin de analizar el efecto de la sobre expresión de los transgenes a nivel morfológico del sistema radicular, las plantas con raíces transgénicas de entre 1 y 2 cm de largo se transfirieron al invernadero como fue descrito, e irrigaron con medio “i” sin sal o con NaCl 100 mM para las plantas que sobre expresaban *MtHB1*, y NaCl 50 mM para las plantas que sobre expresaban *MtLBD1*. Luego de 21 o 15 días respectivamente, las plantas fueron extraídas del suelo y se midió el peso seco de la parte aérea y radicular, individualmente.

Clonados correspondientes a los estudios transcripcionales

Para los análisis transcripcionales se utilizó el vector binario pKGWFS7, que contiene los genes reporteros *GFP* y *GUS* fusionados corriente abajo del sitio de clonado del promotor correspondiente (<http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php>; Karimi y col., 2002). El gen *GUS* codifica la enzima β -glucuronidasa, cuya actividad es detectable por reacciones histoquímicas y cuantificable mediante ensayos de fluorometría. El clonado de los promotores en este vector se realizó mediante el uso de la tecnología GATEWAY (Invitrogen).

Para el estudio de los genes *MtHB1* y *MtLBD1* (Capítulo 1), se clonaron las regiones promotoras de 2817 pb y 2000 pb corriente arriba del ATG, respectivamente. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos HB1 P F y HB1 P R, y LBD1 P F y LBD1 P R (Tabla M.1). El producto de la amplificación fue clonado directamente en el vector TOPO-D (Invitrogen) que sirvió de clon de entrada para la reacción de recombinación LR con el vector de destino pKGWFS7 (GATEWAY, Invitrogen). Para generar la construcción *Pro-MUT MtLBD1*, se reemplazó el sitio CAATAATTG en la

construcción *Pro-MtLBD1* por la secuencia CAGGATCCG, utilizando los oligonucleótidos LBD mut 5' F y LBD mut 5' R y LBD mut 3' F y por otro lado LBD mut 3' R (Tabla M.1) y subclonando en el vector pBluescript-SK⁻ (Addgene) entre los sitios de restricción *Xba1* y *EcoR1*. Finalmente, esta versión del *Pro-MtLBD1* fue clonada en el vector pKGWFS7.

Respecto a los estudios realizados en el Capítulo 2, se clonó una región de 3030 pb del promotor de *MtRR4* corriente arriba del ATG, con los oligonucleótidos RR4 P F y RR4 P R (Tabla 1), respectivamente. Para la construcción de la región promotora *MtRR4 Δcajas*, se reemplazó el oligonucleótido RR4 P F por el RR4 Δ F, para poder amplificar los primeros 1133 pb corriente arriba del ATG y clonar los amplicones mediante la reacción de recombinación BP en el vector de entrada pDONR221 (<http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php>; Karimi y col., 2002). Para mutagenizar la Caja 2 del *Pro-MtRR4*, se utilizaron los oligonucleótidos RR4-c2 F y RR4-c2 R (Tabla M.1) y el *kit* QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), siguiendo las indicaciones del fabricante.

También se clonó la región de 2500 pb del promotor de *MtNSP2* corriente arriba del ATG, con los oligonucleótidos NSP2 P F y NSP2 P R (Tabla M.1). La región entre las posiciones - 616 pb y - 802 pb fue reemplazada por el sitio *BamH1* por amplificación utilizando los oligonucleótidos NSP2 Δ 5' F y NSP2 Δ 5' R y por otro lado NSP2 Δ 3' F y NSP2 Δ 3' R (Tabla M.1) y subclonado en el vector pBluescript-SK⁻ (Addgene) entre los sitios de restricción *Xba1* y *EcoR1*. La versión completa y la versión *Δcajas* del *Pro-NSP2* fueron finalmente clonadas en el vector pKGWFS7 mediante la tecnología de GATEWAY (Invitrogen).

Análisis histoquímico de la actividad β-glucuronidasa

Las raíces transformadas se analizaron en condiciones basales o en respuesta a un estímulo. Para ello, las mismas fueron lavadas en solución Na₂HPO₄ 50 mM pH 7,0 durante algunos minutos con el objetivo de eliminar restos de medio de cultivo. Se transfirieron a una solución Na₂HPO₄ 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1 %, X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucurónido) 2 mM, se les aplicó vacío durante 5 min y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 2-16 h (Manavella y col., 2008). Luego de la incubación se fijaron en una solución de formaldehído 10 % v/v, etanol 20 % v/v y

ácido acético 5 % v/v durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70 % para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4 °C hasta ser fotografiados. Las raíces completas fueron observadas y fotografiadas con el microscopio Nikon AZ100 equipado con una cámara Nikon DS-Ri1, o utilizadas para cortes histológicos. En el caso de los nódulos simbióticos, se los incluyó en agarosa al 3 %, para ser cortados en secciones de 80 µm de espesor con un vibrótomo VT 1200S (Leica Microsystems). Las muestras fueron clarificadas rápidamente con hipoclorito de sodio (Pichon y col., 1992) y finalmente, observadas y fotografiadas con un microscopio DMI6000B equipado con una cámara DFC 300 (Leica Microsystems). Para la observación y análisis de las raíces laterales en formación, las muestras se incluyeron en la resina Technovit 7100 (Kulzer and Co.) y se cortaron secciones de 7 µm con un micrótomo Leica RM 2155. Por último, se tiñeron con rojo de rutenio durante 5 min (0,005 %, Sigma), se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se montaron con el sistema de Eukitt (Agar Scientific). Las secciones se observaron y fotografiaron con el microscopio Nikon AZ100 equipado con una cámara Nikon DS-Ri1. En todos los casos, las fotografías que se muestran en este trabajo representan al menos 25 raíces transgénicas independientes para cada experimento.

Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa

El procesamiento de las raíces en mortero se llevó a cabo agregando N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, y luego 500 µl de la solución amortiguadora de extracción. La mezcla se transfirió a un tubo y se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en baño de hielo.

La reacción fluorométrica se realizó siguiendo el método descrito por Welchen y González (2005). Se agregaron 2,5 µl de extracto proteico a 200 µl de una solución 1 mM de sustrato MUG (4-metilumbelliferil-β, D-glucuronido) disuelto en metanol 40 %. Los 200 µl de cada reacción se incubaron a 37 °C en baño de agua durante 20 min. Para detener la reacción enzimática se utilizaron 800 µl de NaCO₃ 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmol de MU (4-metilumbelliferona).min⁻¹.µg de proteínas totales⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs concentración de producto 4-MU. A fin de eliminar la actividad enzimática endógena, a cada lectura de determinación enzimática se le restó el valor

correspondiente al extracto proteico proveniente de plantas no transformadas. En el caso de la determinación de la actividad de *Pro-MtRR4* y *Pro-MtNSP2* en respuesta a BAP, de cada planta debidamente identificada, primero se extrajo una muestra de proteínas en condiciones basales y las plantas se dejaron reposar durante 72 h, luego de las cuales se llevó a cabo el tratamiento de 3 h con BAP 10^{-7} M. Una vez finalizado el tratamiento se hizo una nueva extracción de proteínas. El resultado se expresó como la relación de la actividad de la enzima β -glucuronidasa después y antes de la inducción por BAP.

Las medidas fluorométricas se realizaron en un equipo *VersaFluor™ Fluorometer System* de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 ml.

Tinción de las raíces con lugol

Para la tinción con lugol, las raíces se clarificaron durante 1 min en NaClO 50 %, y luego incubadas con lugol (Sigma) durante 5 min. Finalmente, se lavaron con agua estéril (Bright y col., 2005), para ser observadas y fotografiadas con el microscopio Nikon AZ100 equipado con una cámara Nikon DS-Ri1.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina para realizar una curva de calibrado. Las determinaciones se realizaron con 2 μ l de extracto proteico en 500 μ l de agua destilada y 500 μ l del reactivo de Azul Brillante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G-250 10 mg en 100 ml de etanol absoluto 5 % v/v y ácido fosfórico 10 % v/v). La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro a 595 nm. Se utilizó la curva patrón para determinar el contenido proteico total de cada una de las muestras.

Expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*

Para expresar en forma recombinante en bacterias, el dominio HD-Zip de MtHB1 y el dominio MYB de MtRR1 se clonaron en fase con la proteína de fusión GST entre los sitios de restricción *EcoR*I y *Bam*H1 del vector de expresión pGEX-3X

(Smith y Johnson, 1988). En el caso de *MtHB1*, se utilizaron los oligonucleótidos HB1 BD F y HB1 BD R (Tabla M.1) para clonar la región codificante de los aminoácidos 1 a 142. Para *MtRR1* se utilizaron los oligonucleótidos RR1 BD F y RR1 BD R (Tabla M.1) para clonar la región codificante de los aminoácidos 69 a 229. Las construcciones plasmídicas sirvieron para transformar en ambos casos la cepa *E. coli* JM109 (GE Healthcare).

Las células transformadas con la construcción deseada se hicieron crecer hasta saturación en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina, a 37 °C y con agitación. Una dilución 1:100 en el mismo medio se incubó a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una DO_{600} : 0,8. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la adición de IPTG 0,3 mM (concentración final). El cultivo fue incubado a 37 °C con agitación durante 3 h adicionales. Posteriormente, las células fueron cosechadas centrifugándolas a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 1/20 volúmenes de solución amortiguadora de columna, respecto del volumen de medio de cultivo procesado. A continuación se agregó el inhibidor de proteasas PMSF en una concentración final de 0,1 mM. Se rompieron las células aplicando de 5 a 7 pulsos de ultrasonido de 10 s cada uno, separados por intervalos de 10 s en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-Cell™ VCX-600, Sonics & Materials). Los lisados celulares se clarificaron centrifugando a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C y las fracciones sobrenadante y precipitada fueron recolectadas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

Se tomaron alícuotas de ambas fracciones, y éstas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se llevó a cabo en geles verticales siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizó una relación de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8. El gel de separación se preparó con una concentración final de acrilamida del 12-15 % (p/v) y del 6 % (p/v) en los geles de concentración. La separación electroforética se realizó en solución amortiguadora de corrida 1 x, aplicando una corriente de intensidad constante a 25 mA.

Las muestras a sembrar fueron previamente desnaturalizadas mediante el agregado de un volumen de solución de siembra e incubación de 3 min en baño a 100 °C.

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron visualizadas en el gel por tinción con una solución de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma) 1 % (p/v) en una mezcla de etanol:ácido acético:agua (50:10:40). El gel se incubó en un baño de esta solución durante algunas horas en una estufa a 65 °C. Una vez teñido, el gel fue retirado del baño para ser decolorado con una mezcla etanol:ácido acético:agua (25:10:65). Cuando el gel recobró la transparencia y sólo las bandas de proteínas conservaban el color azul del colorante se puso fin a la decoloración. Como marcador de masa molecular se usó LMW Calibration Kit for SDS (Amersham Biosciences). Sembrando 3 µl del mismo, se observaron las siguientes bandas: 97 kDa (1,005 µg), 66 kDa (1,245 µg), 45 kDa (2,2 µg), 30 kDa (1,245 µg), 20 kDa (1,2 µg) y 14,4 kDa (1,74 µg).

Purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad

Una vez verificada su expresión en forma soluble, se procedió a purificar la proteína recombinante expresada en *E. coli* como producto de fusión a la proteína glutatión S-transferasa (GST) según describieron Kaelin y col. (1992). El procedimiento que se siguió fue el descrito por GST Gene Fusion System (Pharmacia Biotech). El sobrenadante resultante de la centrifugación de los lisados celulares se diluyó 3-5 veces en solución amortiguadora de columna y se sembró en una columna de glutatión-agarosa (Pharmacia Biotech), previamente equilibrada en la misma solución. Se empleó aproximadamente 1 ml de matriz para un volumen de partida de medio de cultivo de 100 ml. El extracto proteico soluble se hizo recircular por la columna mantenida a 4 °C entre 3 y 5 veces para lograr una eficiencia de unión máxima a la fase sólida. Posteriormente, se lavó la columna con 8 volúmenes de solución amortiguadora de columna. La proteína unida fue eluída en fracciones de 200 µl, empleando una solución de de glutatión reducido (Sigma-Aldrich) 10 mM en Tris-HCl 50 mM. Las fracciones eluídas fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Obtención de oligonucleótidos sintéticos doble hebra y marcación radioactiva de los mismos

Las hebras de cada uno de los oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 1 fueron sintetizadas químicamente en forma separada (Alpha DNA). Para todos los oligonucleótidos doble hebra, los extremos son idénticos, diferenciándose únicamente en el pseudopalíndromo central de 9 pb, cuyas secuencias respectivas se mostrarán en las leyendas de las figuras del Capítulo 1:



La hibridización de las hebras complementarias se llevó a cabo mezclando 400 ng de cada una de ellas en un volumen de 20 μl finales de agua. La solución se mantuvo durante 5 min a una temperatura de 85 $^{\circ}\text{C}$, dejando luego que ésta baje gradualmente hasta alcanzar las condiciones ambientales. Dos μl de la solución de oligonucleótido doble hebra fueron incubados en un volumen final de 50 μl , en presencia de 10 μCi [^{32}P]- αdATP (3000 Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM c/u, 1,5 U de Klenow (Promega) y solución amortiguadora 1 x suministrada por el proveedor de la enzima. La reacción de marcación se llevó a cabo durante 16 h a temperatura ambiente y el [^{32}P]- αdATP no incorporado se eliminó en columnas de Sephadex G-50 según la técnica de Penefsky descrita por Ausubel y col. (1987).

Ensayos de retardo en geles

Los ensayos de retardo en geles fueron realizados según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993). Se incubaron 20 ng (GST-MtHB1) o 1 μg (GST-MtRR1) de proteína de fusión purificada, en presencia de ADN doble hebra marcado radiactivamente con [^{32}P]- αdATP (5000 $\mu\text{Ci}/\text{calle}$) en un volumen final de solución de unión de 20 μl . Después de incubar durante 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$, se adicionó ficoll hasta 2,5 % (p/v) final, y las mezclas de unión se sembraron sobre un gel de poliacrilamida no desnaturizante previamente precorrido a 100 V constantes durante 90 min. La solución

de corrida utilizada fue TBE 0,5 x. La siembra se hizo con la corriente encendida a la misma diferencia de potencial que durante la precorrida y luego se modificó a 120 V constantes. La electroforesis se dejó transcurrir aproximadamente 1,5 h. Posteriormente el gel se secó y se expuso a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 16 h.

Ensayos de competencia

Para una identificación inequívoca de la secuencia que es unida específicamente por la proteína *in vitro*, se hicieron ensayos de competencia en geles de retardo, agregando a cada mezcla de reacción un exceso molar de 20 veces de cada oligonucleótido competidor sin marcar, antes de agregar el oligonucleótido marcado.

Selección de sitios de unión específicos (SELEX)

Para seleccionar las moléculas de ADN reconocidas específicamente por MtRR1 *in vitro*, se aplicó la técnica de selección de oligonucleótidos de secuencia al azar, también conocida como SELEX (del inglés, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*; Oliphant y col., 1989). Para ello se siguió el procedimiento descrito por Blackwell y Weintraub (1990). La separación de los oligonucleótidos unidos a la proteína de los que no lo fueron se logró sembrando la mezcla de unión en un gel en condiciones nativas, que permite separar, de acuerdo a su movilidad electroforética, el ADN libre (de mayor movilidad), de los complejos ADN-proteína (de movilidad menor).

Para esta técnica se utilizó un oligonucleótido doble hebra de 52 pb, marcado radioactivamente con $[^{32}\text{P}]\text{-}\alpha\text{dATP}$, cuya secuencia es:

5'-GATGAAGCTTCCTGGACAATNNNNNNNNNNNGCAGTCACTGAAGAATTCT-3'.

El mismo fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos SELEX A y SELEX B (Tabla M.1).

Las reacciones de unión y la electroforesis se llevaron a cabo como se describe más arriba utilizando la proteína de fusión GST-MtRR1 purificada. Luego del revelado de las placas autorradiográficas se escindieron del gel seco las zonas de migración de los complejos ADN-proteína con la ayuda de un bisturí. Los oligonucleótidos se

eluyeron empleando 1 ml de solución de elución. Luego de 6 h de elución a 37 °C, la mezcla se sometió a extracción con fenol/cloroformo, y el ADN fue precipitado en presencia de 2,5 µg ARNt y 2 volúmenes de etanol absoluto.

Síntesis y amplificación de oligonucleótidos doble hebra

Tanto el oligonucleótido simple hebra utilizado como el ADN unido y eluido de los geles de retardo se amplificaron por PCR empleando 1 µl de molde y los oligonucleótidos SELEX A y SELEX B (Tabla 1), por acción de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Pormega). La PCR consistió de 18 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C, y 1 min a 72 °C. El número de ciclos fue de 12 desde la cuarta ronda de SELEX. Posteriormente, los oligonucleótidos amplificados fueron purificados en geles de poliacrilamida nativos al 15 % (p/v) y la mezcla se sometió a nuevos ciclos de selección y amplificación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Los geles de poliacrilamida al 15 % (p/v) se realizaron a partir de acrilamida/bisacrilamida 38:2, 0,6 ml de solución amortiguadora TBE 10 x, en un volumen final de 6 ml. La gelificación se logró mediante el agregado de 12,5 µl de APS 30 % (p/v) y 3,6 µl de TEMED. Se usó como soporte del gel al equipo Miniprotean III (Bio-Rad Laboratoies Inc., USA). Las corridas electroforéticas se realizaron en TBE 1 x a 20 mA constantes. Una vez finalizadas, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0,3 µg/ml durante 20 min. Las bandas fueron visualizadas sobre transiluminador de luz UV y escindidas del gel para su elución. Ésta se realizó en las mismas condiciones que en el caso de la selección de sitios de unión específicos.

Marcación radioactiva de oligonucleótidos doble hebra obtenidos por PCR

La marcación de los oligonucleótidos doble hebra se realizó mezclándolos con 400 ng del oligonucleótido A o B. Los oligonucleótidos doble hebra de la mezcla fueron deshíbridos en un baño a 75 °C durante 5 min al que se dejó alcanzar lentamente la

temperatura ambiental, para permitir el anillado de las hebras simples con los oligonucleótidos SELEX A o SELEX B. La mezcla se incubó en presencia de 10 μ Ci [32 P]- α dATP (3000 Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM c/u, solución buffer 1 x suministrada por los proveedores de la enzima, y 1,5 unidades de Klenow (Promega). La reacción de marcación se llevó a cabo durante 16 h a temperatura ambiente y el 32 P-dATP no incorporado se eliminó en columnas de Sephadex G-50 (Amersham) según la técnica de Penefsky descripta por Ausubel y col. (1987).

Clonado molecular de los oligonucleótidos seleccionados

El clonado de los oligonucleótidos se hizo en el vector comercial TOPO 2.1TM (Invitrogen), que consta de un dTTP en cada extremo 3' protuberante, que puede ser complementado para la ligación, por un dATP que deja protuberante la enzima *Taq* ADN polimerasa en su amplificación. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el producto de ligación por el método de electroporación. La suspensión conteniendo células transformadas fue sembrada en placas con medio sólido LB agar suplementado con 100 μ g/ml de antibiótico ampicilina, X-GAL e IPTG para la identificación de las colonias de células transformadas con el plásmido y el inserto deseado. Se hicieron repiques de 40 colonias blancas aisladas en medio LB fresco suplementado con ampicilina en la misma concentración, y los cultivos se dejaron crecer durante 16 h. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de todos los cultivos. Para constatar la presencia de inserto de tamaño apropiado en los clones, se llevó a cabo un corte con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega), cuyos sitios de reconocimiento flanquean el sitio de inserción en el vector utilizado. El producto de la digestión enzimática fue sembrado en geles de poliacrilamida al 15 % (p/v), corrido electroforéticamente y teñido de igual manera que en la técnica descripta en el apartado.

Preparación de los extractos de proteínas nucleares

Los extractos de proteínas nucleares de las raíces fueron realizados usando la técnica descripta por Maliga y col. (1995). Se colocaron 5 ml de solución de homogeneización por gramo de tejido fresco y la mezcla se licuó en una licuadora de uso doméstico (Philips). El homogeneizado se filtró por una tela de pañal y una de tipo

nylon mesh (una capa de cada una). Luego se procedió de la siguiente manera: se centrifugó 20 min a 4 °C a 5000 rpm; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado cuidadosamente en solución de homogeneización. La suspensión obtenida se volvió a centrifugar durante 10 min a 1912 g y el precipitado se resuspendió en solución de homogeneización. Se repitió este último paso 10 min a 1464 g y luego 8 min a 1464 g, y por último 6 min a 1464 g. Se descartó el máximo volumen de solución de homogeneización para luego resuspender los núcleos en el mínimo volumen de solución de congelamiento (500 µl). La solución se congeló rápidamente en N₂ líquido y se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso.

Para preparar los extractos, las suspensiones congeladas se descongelaron en hielo y se les agregó NaCl hasta una concentración final de 0.47 M (aprox. 182 µl de solución de lisis por cada ml de suspensión de núcleos). La mezcla se agitó durante 30 min a 4 °C y se centrifugó 20 min a 12.000 g (10000 rpm) a 4 °C para bajar la cromatina. Cuidadosamente se tomó el sobrenadante para que no se contamine con el precipitado y éste se dializó 3-4 horas contra una solución de diálisis en la heladera cambiando la solución de diálisis al menos 4 veces. Las proteínas se concentraron en columnas Amicon-Centricon 10, llevándolas a una concentración final de 1-3 mg/ml.

La calidad de las muestras de proteínas fue analizada por SDS-PAGE y la concentración de éstas fue determinada por la técnica de Sedmak y Gorssberg (1977).

Ensayo de inmuno precipitación de la cromatina seguido de PCR

Para realizar el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina se decidió expresar en las raíces una construcción quimérica de MtHB1 seguido de una cola de d de 2 Hemoaglutininas, reconocida por anticuerpos comerciales (Miltenyi Biotec). La construcción *ProMtHB1:MtHB1:2xFLAG:2xHA* se obtuvo gracias a la tecnología de MultiSite GATEWAY Cloning System (Invitrogen), usando como vector de destino al pK7m34GW (Karimi y col., 2002). Se obtuvieron raíces transgénicas transformadas con este vector binario y se utilizaron 2 g de estas raíces para el ensayo así como la misma masa de raíces salvajes como controles. Se obtuvieron núcleos siguiendo la técnica descrita más arriba hasta llegar al paso anterior al lisado, y en ese momento se fijaron inmediatamente con formaldehído 1 % durante 20 min. La inmuno precipitación de la cromatina se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hirsch y col. (2009) utilizando

el ChIP assay kit (Millipore) con ciertos cambios: se reemplazaron los pasos de lavado y reconocimiento del kit Millipore por los anticuerpos anti-HA y las columnas de separación de μ MACS (Miltenyi Biotec). Para la amplificación de la región circundante al elemento *cis* en el ProMtLBD1, se utilizaron los oligonucleótidos LBD Ch F y LBD Ch R (Tabla M.1).

Ensayo de microarreglos, procesamiento de la información y análisis estadístico

Para el ensayo de microarreglos de los ápices de las raíces en respuesta a las citoquininas, se transfirieron plántulas a macetas llenas de una mezcla de perlita y arena (3:1) con un fondo de malla metálica. Luego de aproximadamente 10 días, las raíces pasaron a través del fondo de malla metálica (como fue descrito por Gruber y col., 2009). El medio de cultivo líquido con el que se irrigaban las plántulas (SN/2, Soluplant 18.6.26, Duclos International) se reemplazó por medio fresco suplementado o no con BAP 10^{-7} M durante 1 h. Se realizaron 4 replicados biológicos para cada condición (control y tratamiento), usando al menos 9 plantas por replicado. Se cortó aproximadamente 1 cm del ápice de cada raíz y se congelaron en nitrógeno líquido, conservándose a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN. Se llevó a cabo un control de calidad del ARN con el Bioanalizador Agilent 2100 (Aligent). Se utilizaron 2 μ g de cada muestra para sintetizar ADN copia marcado con Cy5/Cy3, utilizando el *kit* Amino Allyl Message AmpTM II RNA Amplification (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante, con 2 muestras independientes marcadas con Cy5 y 2 con Cy3. El ADNc fue hibridizado luego con los arreglos de oligonucleótidos de 70 pb Mt16K+ (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>; número de acceso A-MEXP-138, base de datos ArrayExpress) por 16 h a 60 °C, en un horno giratorio a 6 rpm en una cámara de hibridización (Aligent). Se lavaron las láminas utilizadas en la oscuridad y con agitación suave con SSC 1 x, SDS 0,2 % por 10 min a 50 °C, SSC 0,1 x por 10 min, SSC 0,05 x por 5 min 2 veces, y finalmente con agua por 1 min. Estos pasos de lavado se hicieron a temperatura ambiente. Se hizo la lectura de las láminas hibridizadas con un escáner de 2 láseres Genepix (Axon Instruments), y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa GenePix 6.0 (Molecular Devices). La transformación y normalización de los datos se llevó a cabo con el programa MAnGO R script (versión 1.0; Marisa y col., 2007), que consistió en una serie de correcciones y sucesivas

normalizaciones (Yang y col., 2002). El análisis diferencial se basó en el Test t empírico de Bayes moderado, ajustado con una corrección de test múltiple (Benjamini y Hochberg, 1995). El mismo se encuentra disponible en <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/> con el número de acceso E-MEXP-1442). Se seleccionaron los genes expresados diferencialmente considerando un umbral establecido en valores p ajustados y el factor de inducción, además de un umbral del ruido de fondo basado en el promedio de la intensidad de los dos canales (media $A > 7$ en una escala de logaritmo en base 2. Para ello, se consideraron los controles negativos incluidos en el microarreglo.

Como herramienta de visualización se utilizó al programa MapMan (disponible para descargar en <http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>; Thimm y col., 2004; Tellström y col., 2007). Para predecir categorías funcionales enriquecidas en genes regulados diferencialmente, se consideró un umbral establecido por un $|\text{Factor de Cambio}| > 1,5$ y un valor p ajustado $< 0,001$. Se realizó un Test t de Fisher exacto ($p > 0,05$) para seleccionar las categorías con más de 10 elementos, de los cuales al menos 3 fueron regulados diferencialmente por citoquinas.

Análisis bioinformático

Para la construcción del árbol filogenético de las proteínas de la familia LBD, primero se identificaron aquellas conocidas de *M. truncatula* haciendo uso de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El programa ProtTest (Abascal y col., 2005) es el que determinó el modelo mejor adaptado a la evolución de las proteínas. En este programa se seleccionó una matriz WAG más los modificadores G (gamma) y F (frecuencias) para las secuencias completas. La reconstrucción del árbol filogenético se llevó a cabo usando un algoritmo Bayesiano implementado por el paquete MrBayes 3 (Huelsenbeck y col., 2001), incluyendo todas las proteínas LBD conocidas de *M. truncatula*, todas las proteínas de la Clase II de Arabidopsis y un número similar de proteínas de la Clase I de Arabidopsis.

El alineamiento de las proteínas MtHB1, AtHB7 y AtHB12 se llevó a cabo con el programa MAFFT 6.0 (Katoh y Toh, 2008) y la herramienta de visualización MView (Brown y col., 1998).

Conjuntamente con el grupo de trabajo del Dr. Jérôme Gouzy (INRA Toulouse, Francia), desarrollamos un programa para realizar la búsqueda del elemento en *cis* reconocido por MtHB1 en los promotores de los genes regulados por NaCl (Gruber y col., 2009), así como para buscar las cajas derivadas del consenso del SELEX de MtRR1 en los promotores de los genes regulados por citoquininas. El programa *GetAndScanPromoterRegionsFromAListOfMedicagoIDsToUniqueIDs*, disponible para su uso en <http://www.legoo.org/>, está basado en el desarrollo de REMORA Workflows (Carrere y Gouzy, 2006). Para el trabajo relacionado a MtHB1 se utilizó una lista de genes regulados diferencialmente en los ápices de las raíces por estrés salino (Gruber y col., 2009). Se establecieron los siguientes parámetros de búsqueda: largo del promotor: 2000 pb; secuencia de PatScan: CAATNATTG, donde la N fue reemplazada en sucesivas búsquedas por A, C, G o T; seguido de [0,0,0], lo que implica que no se aceptó ningún error en la concordancia de la secuencia. Para el estudio de MtRR1, se utilizó la lista de genes diferencialmente regulados por citoquininas, como fueron definidos anteriormente. Se establecieron los siguientes parámetros: largo del promotor: 2500 pb; secuencia de PatScan: derivada en cada caso del consenso del SELEX, indicadas en la Tabla 2.2 del Capítulo 2. La secuencia estuvo seguida en todos los casos de [0,0,0], lo que implica que no se aceptó ningún error en la concordancia de la misma.

Números de acceso

Las secuencias de los genes estudiados en este trabajo pueden ser encontradas en el Arabidopsis Genome Initiative o la base de datos GenBank/EMBL, con los siguientes números de acceso: *M. truncatula* (MtGI9) MtHB1 (o HD1374), TC117282; MtLBD1, TC121747; MtACT, TC106786; MtH3l, TC117750; MtRBP, TC113147; Arabidopsis AtHB7, AT5G46880.1; y AtHB12, AT3G61890.1. La lista de números de acceso de los genes estudiados en el Capítulo 2, se detalla en la Tabla 2.1 del Anexo 1.

Tabla M.1 Lista de oligonucleótidos utilizados

Uso	Nombre	Secuencia en sentido 5'-3'
Clonado y mutagénesis dirigida	HB1 ADNc F	GGGTCTAGAATGGAATATAGCCAATA
	HB1 ADNc R	GGGGGATCCTCAAGACCAAAAAGTCCCACCATTG
	LBD1 ADNc F	GGGTCTAGAATGAGTTGCAACGGTTGCC
	LBD1 ADNc R	GGGGGATCCATCGATCATAAGAATAGTGTAAGG
	HB1 P F	CCACAAAATTTTCCAAAAAATTC
	HB1 P R	TTGAGTTCTTATCATGAGGGG
	LBD1 P F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAACAAATAGTAATTTG
	LBD1 P R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTGTAGTTAATCATGTGAACAAAG
	LBD mut 5' F	GGGGAATTCTAATGGAACAAATAGTAATTTGC
	LBD mut 5' R	GGGGGATCCTGGTGTATCTTCTTTTTTTATAAT
	LBD mut 3' F	GGGGGATCCGTCCTTGCATTTACAAACTAA
	LBD mut 3' R	GGGTCTAGATTTTAGTTAATCATGTGAAGAAAG
	RR4 P F	CACCCTTTGTCTTTATCTCATATACTC
	RR4 P R	CATGCCATGGCACTCTCTTTGAAGAAAAAAAAGA
	RR4 Δ R	CACCGGTACCCCGAGAAAATAACT
	RR4-c2 F	TAGGGACTAAAACCAAAATACTGCATA
	RR4-c2 R	GTTTTGGTCCCTGCAAATATGCAGTATT
	NSP2 P F	CACCACGTTGAGCAATGGCGTAAGAG
	NSP2 P R	GGTATAATTAAGTTAGGTGTTTAAG
	NSP2 Δ 5' F	GGGGAATTCACGTTGAGCAATGGCGTAAG
	NSP2 Δ 5' R	GGGGGATCCAGCACTTAACGAGTCTTCAAATTG
	NSP2 Δ 3' F	GGGGGATCCTAAATAATAAAAAAAAAAAAAACAATATT
	NSP2 Δ 3' R	GGGTCTAGAGGTATAATTAAGTTAGGTGTTTAAG
	HB1 BD F	GGGGGATCCTGGAATATAGCCAATA
	HB1 BD R	GGGGAATTCTTGTGAACTACTCTGACTTTGC
	RR1 BD F	CGCGGATCCAATTTCCACGGTGCCC
	RR1 BD R	CACGAATTCGTCTGGATATCCTTGCTG
	SELEX A	GATGAAGCTTCCTGGACAAT
	SELEX B	CAGAATTCTTCAGTGACTGC

Uso	Nombre	Secuencia en sentido 5'-3'
PCR en tiempo real	H3L F	ATTCCAAAGGCGGCTGCATA
	H3L R	CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG
	RBP1 F	AGGGGCAAGTTCCTTCATTT
	RBP1 R	GGTAGAAGTGCTGGCTCAGG
	ACTIN F	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG
	ACTIN R	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC
	HB1 F	ATTCCAAAGGCGGCTGCATA
	HB1 R	CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG
	LBD1 / LOB F	TGGCAATTCTGTCAACTTGG
	LBD1 / LOB R	CAACGTGGAAGACTCCGATT
	ERN1 F	GGAAGATGGTGCTGTTGCTT
	ERN1 R	TGTTGGATTGTGAACCTGACTC
	NSP2 F	TTCATTGGAGGCTGGTTTTTC
	NSP2 R	CACCCACCTCTTCAACCCTA
	RR4 F	ATGCTTTTGTTCGGGTTTA
	RR4 R	CTGCACCTTCCTCCAAACAT
	GST F	GTTGGTAGGCTTTTGGGTGA
	GST R	CTGCAATTGGTTTCTGAGCA
	CKX F	CACAGAATCACCACCAAACG
	CKX R	GCCGCCACTGTAAATTTGT
	bHLH F	GTCTGTGGTGACGGTTGATG
	bHLH R	CCCTATTCCCATCTGAGCAA
	NAM F	TGAAGTGAGATTGCCACCAG
	NAM R	TGGGTATTTGGCTTCTTTGG
	RAV F	CGGTTTGTTCACACGGTCT
	RAV R	ACCCCAAATAACCGAACCAT
	SCR F	GGCAGGTCAGGAACAAAAGA
	SCR R	TCCCTGCAAAACCCACTTAC
	bZIP F	TGTGATGCGCACTTCTTTTC
	bZIP R	TTGCGGAATCATGCAGTTAG
LBD Ch F	CATTGAAGGGACACAGAATAC	
LBD Ch R	TGGACCCATTATAACCCAG	

Uso	Nombre	Secuencia en sentido 5'-3'
Ensayos de restardo en geles del Capítulo 2	Selex Consenso	AATTCACATATAATGAGACTAGTTGAG
	Selex Consenso R	GATCCTCAACTAGTCTCATTATATGTG
	Caja 1	AATTCACATATAACGAGACATATTGAG
	Caja 1R	GATCCTCAATATGTCTCGTTATATGTG
	Caja 2	AATTCACATATAATGAGACATATTGAG
	Caja 2R	GATCCTCAATATGTCTCATTATATGTG
	Caja 3	AATTCACATATAATGGTCTCTATTGAG
	Caja 3R	GATCCTCAATAGAGACCATTATATGTG
	Caja 4	AATTCACATATTTTAGTCTCTATTGAG
	Caja 4R	GATCCTCAATAGAGACTAAAATATGTG
	Caja 5	AATTCACATATAATGAGATTAGCTGAG
	Caja 5R	GATCCTCAGCTAATCTCATTATATGTG
	Caja 6	AATTCACATATGATGAGACTTAATGAG
	Caja 6R	GATCCTCATTAAGTCTCATCATATGTG
	Selex mut	AATTCACATATAATACTGCTAGTTGAG
	Selex mutR	GATCCTCAACTAGCAGTATTATATGTG

Medios de cultivo utilizados en este trabajo

LB	Peptona de carne	10 g/l
	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB agar	Agar	15 g/l
TY	Peptona	5 g/l
	Extracto de levadura	3 g/l
	CaCl ₂	10 mM
TY agar	Agar	15 g/l
Fähraeus	MgSO ₄	5 x 10 ⁻⁴ M
	KH ₂ PO ₄	7 x 10 ⁻⁴ M
	Na ₂ HPO ₄	8 x 10 ⁻⁴ M
	Fe-EDTA	5 x 10 ⁻⁵ M
	NH ₄ NO ₃	10 ⁻⁴ g/l
	MnSO ₄	10 ⁻⁴ g/l

	CuSO ₄	10 ⁻⁴ g/l
	ZnSO ₄	10 ⁻⁴ g/l
	H ₃ BO ₃	10 ⁻⁴ g/l
	Na ₂ MoO ₄	10 ⁻⁴ g/l
	CaCl ₂	1 mM
Medio « i » 40 x		
Solución A.1	KNO ₃	20,2 g/l
Solución A.2	KH ₂ PO ₄	27,2 g/l
Solución A.3	CaCl ₂	73,0 g/l
Solución A.4	MgSO ₄	24,6 g/l
Solución A.5	KSO ₄	43,5 g/l
Solución B	Fe-EDTA	8,2 g/l
Solución C	H ₃ BO ₃	11,0 g/l
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1 g/l
	MnSO ₄	6,2 g/l
	ZnSO ₄	1 g/l
	CuSO ₄	0,5 g/l
	KCl	10 g/l
	H ₂ SO ₄	0,5 ml / l

Mezclar 250 ml de cada una de las soluciones A, 250 ml de la solución B y 13,5 ml de la solución C en un volumen final de 10 l de agua desionizada.

Soluciones

Electroforesis de ADN y minipreparación de ADN plasmídico

TAE 1x	Tris-HAc pH 8,0	40 mM
	EDTA	1 mM

TBE 1x	Tris-HCl	89 mM
	H ₃ BO ₃	89 mM
	EDTA	20 mM
Solución I de miniprep	Tris-HCl pH 8,0	40 mM
	glucosa	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
Solución II de miniprep	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
Solución III miniprep	KAc pH 4,2	5 M
X-GAL	X-GAL	50 mg/ml en dimetilformamida
IPTG	IPTG	119 mg/ml

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

	gel de separación 12 % (p/v)	gel de concentración
Acril/Bisacrilamida 30:0,8	1,6 ml	0,41 ml
Tris-HCl 8x pH 8,9	0,48 ml	---
Tris-HCl 8x pH 6,8	---	0,25 ml
SDS 10% (p/v)	40 µl	20 µl
Agua destilada c.s.p.	4 ml	2 ml
APS 10% (p/v)	26,6 µl	20 µl
TEMED	5,6 µl	2 µl

Tris-HCl 8x pH 8,9	Tris	36,6 % (p/v)
	HCl	3 M
Tris-HCl 8 x pH 6,8	Tris	5,98 % (p/v)
	HCl	0,49 M
Solución amortiguadora 2 x de siembra	Tris-HCl pH 7,0	100 mM
	glicerol	20 % (v/v)
	SDS	4 % (p/v)
	β -mercaptoetanol	10 % (p/v)
	azul de bromofenol	0,01 % (p/v)
Solución amortiguadora 10 x de corrida (Laemmli)	Tris	250 mM
	glicina	2,5 M
	SDS	1 % (p/v)

Extracción de proteínas de plantas para ensayos de fluorimetría

Solución amortiguadora 1x	Na_2PO_4 pH 7,0	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	SDS	0,1 %
	Tritón	1 %
	β -mercaptoetanol	10 mM.

Obtención de extractos nucleares

Solución de homogeneización	sacarosa	250 mM
	NaCl	10 mM
	Pipes pH 7,0	25 mM
	EDTA pH 8,0	5 mM
	MgCl_2	10 mM
	β -mercaptoetanol*	20 mM
	Tritón X-100*	0,1 %

	PMSF*	0,2 mM
Solución de congelamiento	Hepes pH 7,6	50 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	KCl	10 mM
	glicerol	50 %
	DTT*	1 mM
	PMSF*	0,2 mM
Solución de lisis	NaCl	2,5 M
	Hepes pH 7,6	50 mM
	MgCl ₂	5 mM
	KCl	10 mM
	glicerol	20 %
	DTT*	1mM
	PMSF*	0,2 mM
Solución de diálisis	NaCl	40 mM
	Hepes pH 7,6	20 mM
	EDTA	0,2 mM
	glicerol	20 %
	DTT*	1mM
	PMSF*	0,2 mM

* agregar en el momento de usar.

Purificación de proteínas de fusión a GST en pGEX-3X

Solución amortiguadora de columna	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA pH 7,8	1 mM
Solución amortiguadora	Tris-HCl pH 8,0	50 mM

de equilibrado

Solución amortiguadora	glutación reducido	10 mM
de elución	Tris-HCl pH 8,0	50 mM

Geles de retardo

Gel de retardo	acrilamida 30 % (p/v)	6,5 ml
	bisacrilamida 2% (p/v)	1,6 ml
	TBE 10 x	2 ml
	glicerol 50 % (p/v)	2 ml
	APS 30% (p/v)	150 µl
	TEMED	44 µl
	agua destilada c.s.p.	40 ml

Solución de unión	HEPES pH 7,5	20 mM
	KCl	50 mM
	MgCl ₂	2 mM
	EDTA	0,5 mM
	DTT	1 mM

Capítulo 1



“...que el diccionario detenga las balas...”
(Joaquín Sabina)

La regulación de la emergencia de las raíces laterales por el estrés medioambiental requiere de un factor de transcripción de la familia HD-Zip I, MtHB1, en *Medicago truncatula*

La súper familia de factores de transcripción con homeodominio

El homeodominio (HD) está definido por una secuencia de 60 aminoácidos que posee un extremo amino terminal flexible y está plegado en 3 hélices α , conectadas entre sí por una vuelta y un rulo. Las hélices I, II y III se forman con los residuos 10 a 22, 28 a 38, y 42 a 59 respectivamente. El HD es capaz de interactuar en forma específica con el ADN, estableciendo el contacto a través de la hélice III, el brazo N-terminal y el *loop* (rulo) que une las hélices I y II. Es codificado por una secuencia nucleotídica consenso de 180 pb conocida como caja homeótica, del inglés *homeobox*. Este dominio se identificó por primera vez en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* mediante estudios genéticos (Garber y col., 1983). Su nombre deriva del efecto de homeosis, reemplazo completo de un segmento corporal por otro, producido por la mutación puntual o expresión ectópica de uno de estos genes. Por ejemplo, la mutación en *ANTENNAPEdia*, provoca en *Drosophila* el desarrollo de patas en el lugar de las antenas (Figura 1.1). Este descubrimiento (Garber y col., 1983) tuvo lugar en el laboratorio del Dr. Walter Gehring y abrió un campo de estudio acerca de los genes implicados en el desarrollo que significó el Premio Nobel de Medicina para Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschau en el año 1995. Con el transcurso del tiempo, el dominio HD se encontró en FTs de organismos evolutivamente distantes, incluyendo animales, hongos y plantas (Chan y col., 1998). El gen de maíz *KNOTTED1* fue identificado con el uso de transposones y fue el primer gen aislado de plantas que codifica un FT con HD (Vollbrecht y col., 1991). Casualmente, su nombre fue escogido por el fenotipo de hojas anudadas (en inglés *knotted*) que genera la expresión constitutiva de este gen (Figura 1.1B). Desde ese momento, numerosas proteínas con HD han sido identificadas en una gran variedad de plantas.

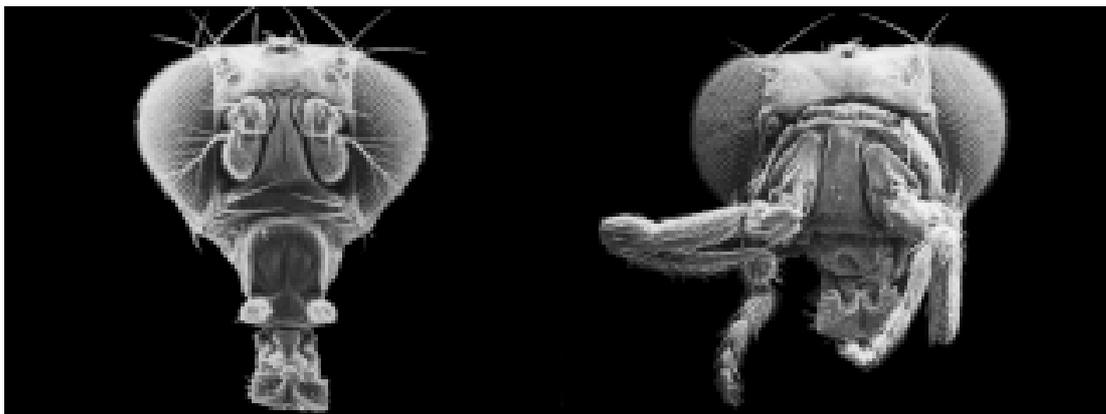


Figura 1.1. Efecto homeótico de la mutación puntual del gen *ANTENNAPEDIA* de *Drosophila melanogaster*. El segmento completo correspondiente a las antenas es reemplazado por patas. Tomado de Turner y Mahowald (1979).

La súper familia de los homeodominios en plantas

Desde la identificación de *KNOTTEDI* se encontró en plantas un gran número de genes que codifican HDs, aunque sólo algunos fueron funcionalmente caracterizados con profundidad. El advenimiento de la obtención de las secuencias expresadas (ESTs) y de genomas de plantas en los últimos años, tales como *Arabidopsis*, arroz, soja y *Lotus* entre otras, facilitó la clasificación certera de estas proteínas en familias y subfamilias, en función de características comunes. Existen en plantas 6 familias de FTs con HD, determinadas por la conservación de secuencias dentro y fuera de este dominio, su ubicación en la molécula, el tamaño de la proteína, la asociación con otros dominios y la estructura génica (Figura 1.2.).

Súper familia de proteínas con homeodominio en plantas

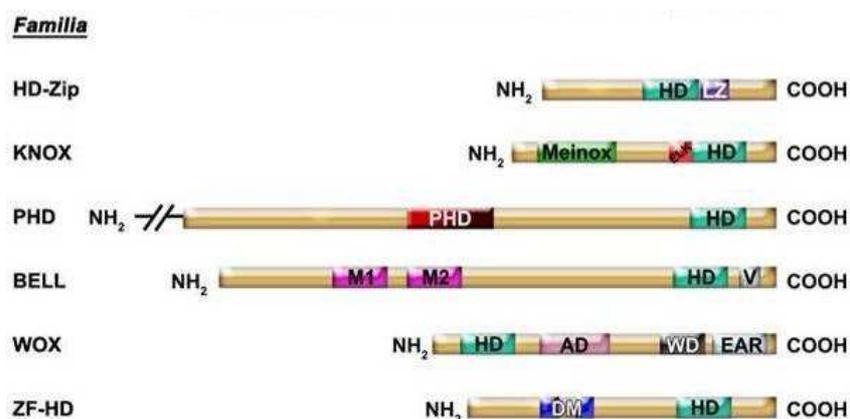


Figura 1.2. Representación esquemática de las estructuras y dominios distintivos de cada familia de proteínas con HD. Abreviaturas: AD, dominio ácido; DM, motivo de dimerización; EAR, motivo de represión amfilíco; ELK dominio nombrado por esta secuencia de amino ácidos conservada, glu (E), leu (L) y lys (K); HD, homeodominio; LZ, cierre de leucinas; M1y M2 conforman el dominio Meinox (asociación entre dominios MEIS y KNOX); PHD, homeodominio de planta; V, caja ‘VSLTLGL’; WD, dominio WUS.

La familia HD-Zip de factores de transcripción

Los genes miembros de esta familia codifican FTs en los cuales al extremo C-terminal del HD le sigue un cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*). La asociación de ambos dominios en una sola proteína sólo se ha encontrado en plantas (Schena y Davis, 1992). El dominio LZ forma una hélice α con residuos de leucina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Esto permite la hetero u homodimerización a través de interacciones hidrofóbicas entre dos polipéptidos (Landschulz y col., 1988; Sessa y col., 1993; González y col., 1997). La Figura 1.3 muestra un modelo de la interacción de dos

HD-Zip homo o heterodimerizados. Esta dimerización es un evento indispensable para el reconocimiento eficiente del ADN (Palena y col., 1998; Tron y col., 2004).

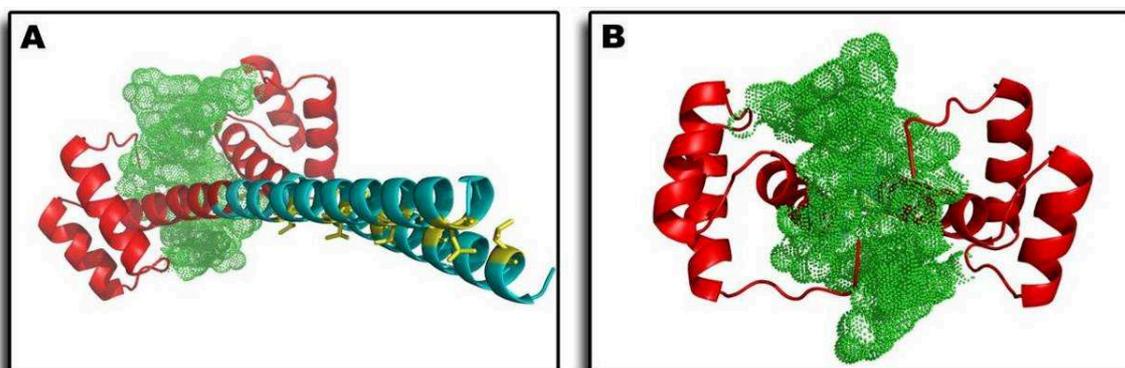


Figura 1.3. Estructura tridimensional de una proteína HD-Zip y su interacción con el ADN. EL ADN es representado con puntos verdes que indican el radio de las fuerzas de van der Waals, el HD está esquematizado en rojo y el LZ en celeste. Las leucinas pertenecientes al cierre están destacadas en amarillo. Las figuras A y B muestran el modelo de interacción desde diferentes ángulos.

La familia HD-Zip se divide, a su vez, en cuatro subfamilias (I a IV) de acuerdo a características distintivas. En la Figura 1.4 se muestra una representación esquemática de la estructura de las proteínas que pertenecen a las distintas subfamilias de HD-Zip y un árbol filogenético de los FTs de tipo HD-Zip de Arabidopsis.

Familia HD-Zip de factores de transcripción

Subfamilia

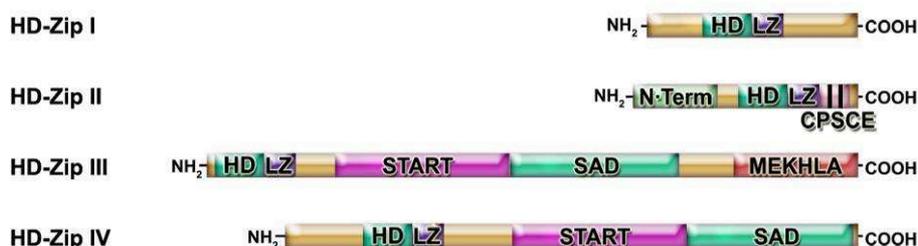


Figura 1.4A: Representación esquemática de las estructuras de los miembros de las cuatro subfamilias HD-Zip. Abreviaturas: dominio MEKHLA nombrado así por la alta

conservación de amino ácidos met (M), glu (E), lys (K), his (H), leu (L), ala (A); N-term, dominio consenso en la región N-terminal; SAD, domino adjunto a START; START, del inglés “*Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain*”.

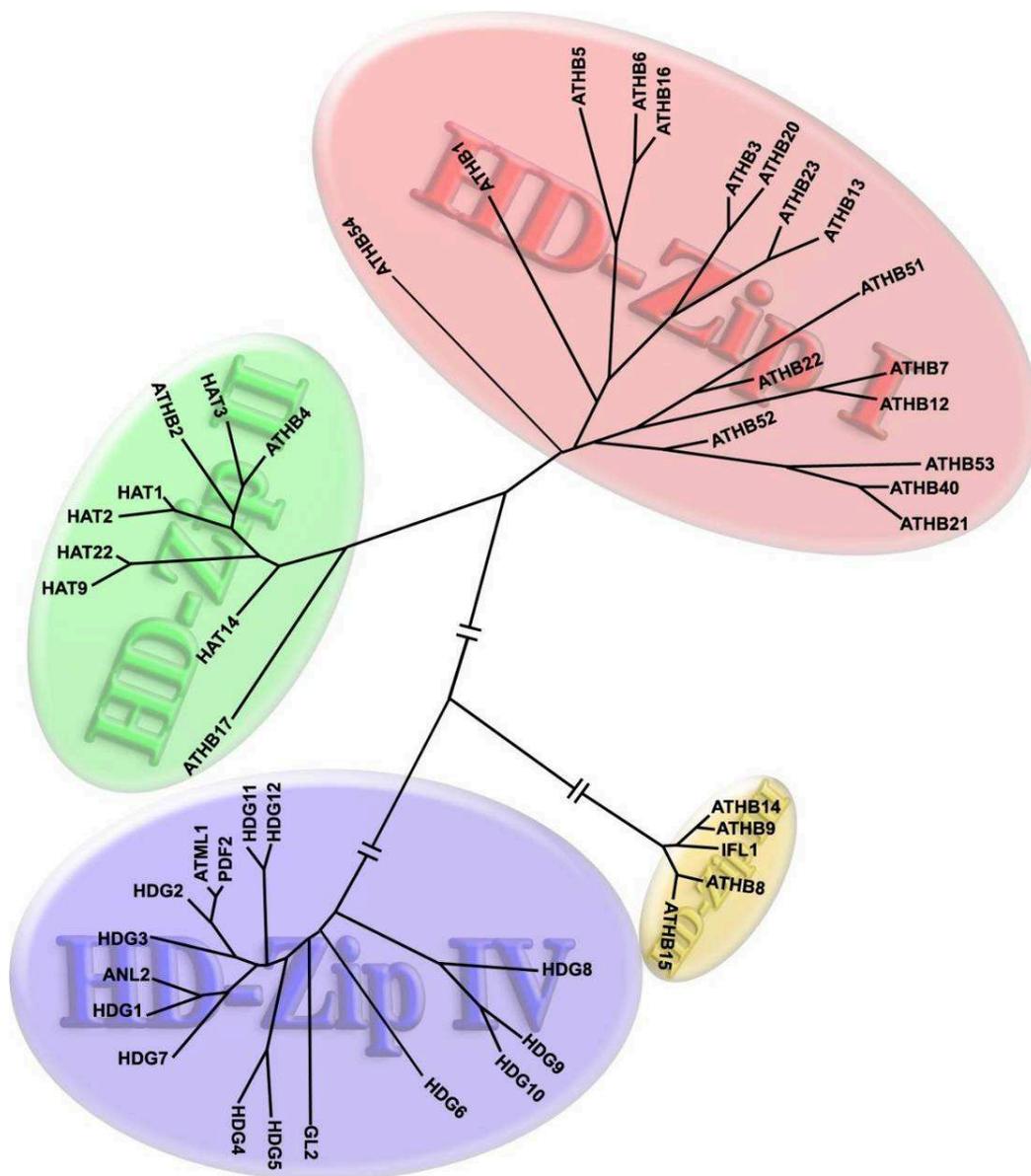


Figura 1.4B. Árbol filogenético construido con las proteínas HD-Zip de Arabidopsis, tomando las proteínas completas. Para la construcción del árbol se utilizó el programa Tree-Puzzle 5.2 (Schmidt y col., 2002).

En la Figura 1.5 se muestra un resumen de los eventos fisiológicos en los que intervienen los miembros de las diferentes subfamilias.

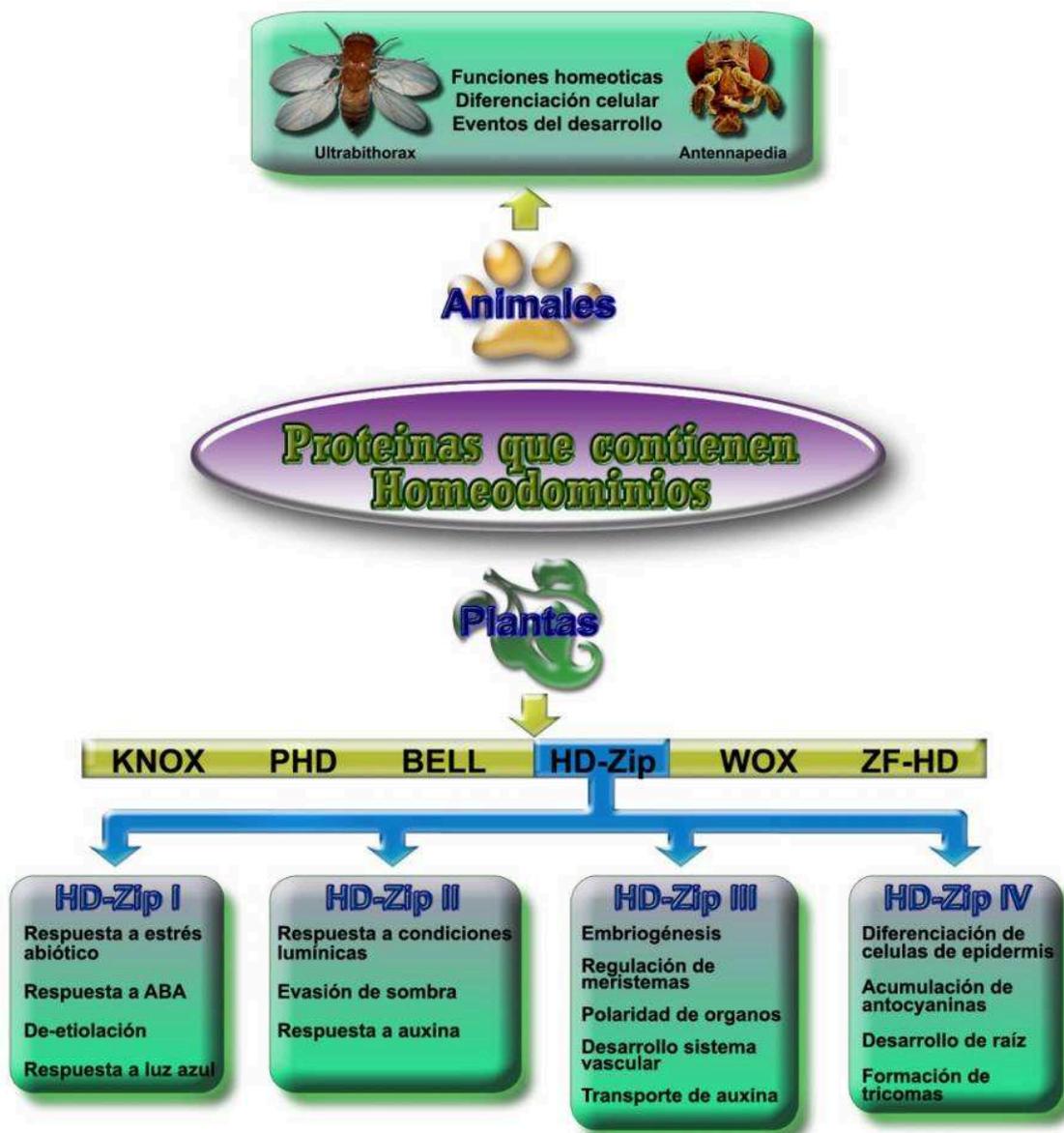


Figura 1.5. Esquema de las funciones conocidas de las proteínas pertenecientes a las subfamilias HD-Zip I a IV.

La subfamilia HD-Zip I

Todos los miembros de la subfamilia I analizados hasta el momento unen *in vitro* la misma secuencia de ADN (CAAT(A/T)ATTG) a través de la hélice III del HD (Palena y col., 1998; Henriksson y col., 2005).

Los genes parálogos *AtHB7* y *AtHB12* comparten una identidad del 80 % en la secuencia aminoacídica codificada de sus dominios HD-Zip y ambos están regulados en forma similar por condiciones de déficit de agua, dependiendo del ABA y de la actividad de las fosfatasa ABI1 y ABI2 (Söderman y col., 1996; Lee y Chun, 1998).

Las proteínas codificadas se expresan en los primordios axilares de los tallos, el meristema apical del tallo, filamentos de anteras y semillas. *AtHB12* también se expresa en los primordios de raíces laterales, en hojas jóvenes y débilmente en el meristema apical de la raíz. La aplicación exógena de ABA o las condiciones de estrés hídrico causan una superposición de los patrones de expresión de *AtHB7* y *AtHB12*, ya que ambos se expanden a casi todos los tejidos de la planta (Olsson y col., 2004). La expresión constitutiva de *AtHB7* en *Arabidopsis* genera una disminución en la velocidad de crecimiento de las hojas y del tallo principal, mimetizando el efecto causado por condiciones de escasez de agua en plantas de tipo salvaje. Además, las hojas de la roseta muestran una forma más redondeada (sin que se vea afectada su área) y pecíolos más cortos (Hjellström y col., 2003). A pesar de esto, el silenciamiento de *AtHB7* no genera un efecto visible en el fenotipo de las plantas, ya sea en condiciones basales o en condiciones de estrés. Basados en estos resultados, los autores propusieron que la función de *AtHB7* podría estar solapada con las de otros miembros de la familia como *AtHB12* (Hjellström y col., 2003). Apoyando esta hipótesis, cuando expresaron *AtHB12* en forma constitutiva en *Arabidopsis*, las plantas presentaron características fenotípicas similares a las de plantas que sobre expresan *AtHB7* (Olsson y col., 2004). Otras características relevantes de las plantas con elevados niveles de *AtHB7* y/o *AtHB12* son el incremento en el número de ramificaciones del tallo con respecto al de sus pares salvajes y un efecto más pronunciado en la inhibición de la elongación de las raíces causado por el agregado de ABA (Olsson y col., 2004). Además, las plantas mutantes que expresan *AtHB7* y *AtHB12* no funcionales presentan una menor sensibilidad a esta inhibición por ABA que las plantas salvajes (Olsson y col., 2004). Cabe destacar que la

inhibición del crecimiento del tallo mediada por *AtHB7* y *AtHB12* es independiente de ABA o de las condiciones de estrés hídrico, mientras que la regulación de ambos genes en la raíz es dependiente de esta fitohormona (Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004).

En girasol, *HaHB4* es un HD-Zip I muy similar a *AtHB7* y 12 (Manavella y col., 2006 y 2008a). El gen *HaHB4* se expresa en muy bajos niveles en condiciones normales. Sin embargo, cuando las plantas se tratan con ABA, manitol, NaCl y especialmente cuando se someten a estrés hídrico, la expresión de este gen aumenta notoriamente en raíces, tallos y hojas (Dezar y col., 2005). Esta regulación tendría lugar a nivel transcripcional (Dezar y col., 2005; Manavella y col., 2008b).

En lo que se refiere a proteínas de tipo HD-Zip de la familia de las leguminosas, el único análisis genético realizado hasta el momento en una planta mutante tuvo como modelo de estudio a la arveja (Hofer y col., 2009). Se demostró que la mutación de un miembro de la subfamilia HD-Zip I, bautizado *TENDRIL-LESS* (en inglés “sin zarcillos”), provoca la pérdida de los zarcillos foliculares que utiliza normalmente la planta para trepar (Figura 1.6).

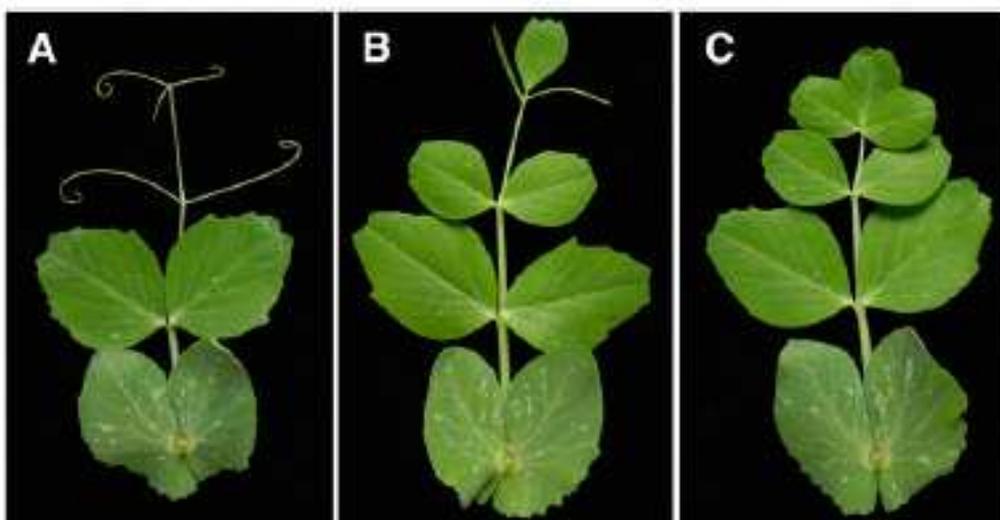


Figura 1.6. Análisis de las plantas mutantes *tendril-less*. A) Hoja de una planta salvaje de arveja de jardín. B) Planta heterocigota *Tl/tl* respecto a la mutación *tendril-less*. C) Planta mutante *tendril-less* homocigota. Adaptado de Hofer y col., 2009.

Resultados

El efecto del estrés salino en la arquitectura y crecimiento radicular de *M. truncatula*

Como mencionamos en la Introducción, el sistema radicular es muy dependiente de los factores externos. Las fitohormonas son las encargadas de traducir las señales del ambiente en la adaptación de la arquitectura y el crecimiento de las raíces. Para ello, los FTs juegan un rol central en la regulación de la expresión génica. En este contexto nos propusimos caracterizar la respuesta morfológica al estrés salino del sistema radicular de *Medicago truncatula*. Además, planteamos dilucidar el rol de un FT de la familia HD-Zip I en este proceso de adaptación al medio.

Con el objeto de caracterizar los posibles cambios en la arquitectura de las raíces de *M. truncatula* cuando las plantas están sometidas a estrés salino, se hicieron germinar semillas de esta leguminosa en una mezcla de arena y perlita con soluciones de NaCl 25, 50, 75 y 100 mM para compararlas con plantas germinadas en las mismas condiciones pero en ausencia de NaCl. Luego de tres semanas de desarrollo, las raíces de las plantas fueron lavadas y examinadas. Determinamos el largo de la raíz principal, la cantidad de raíces laterales emergidas y en formación, así como su peso seco. Las bajas concentraciones salinas (25 mM) indujeron un ligero crecimiento total de las raíces sin alterar su arquitectura, que no se vio afectada la distribución de las raíces laterales iniciadas o emergidas por cm de raíz principal (Figura 1.7A y C).

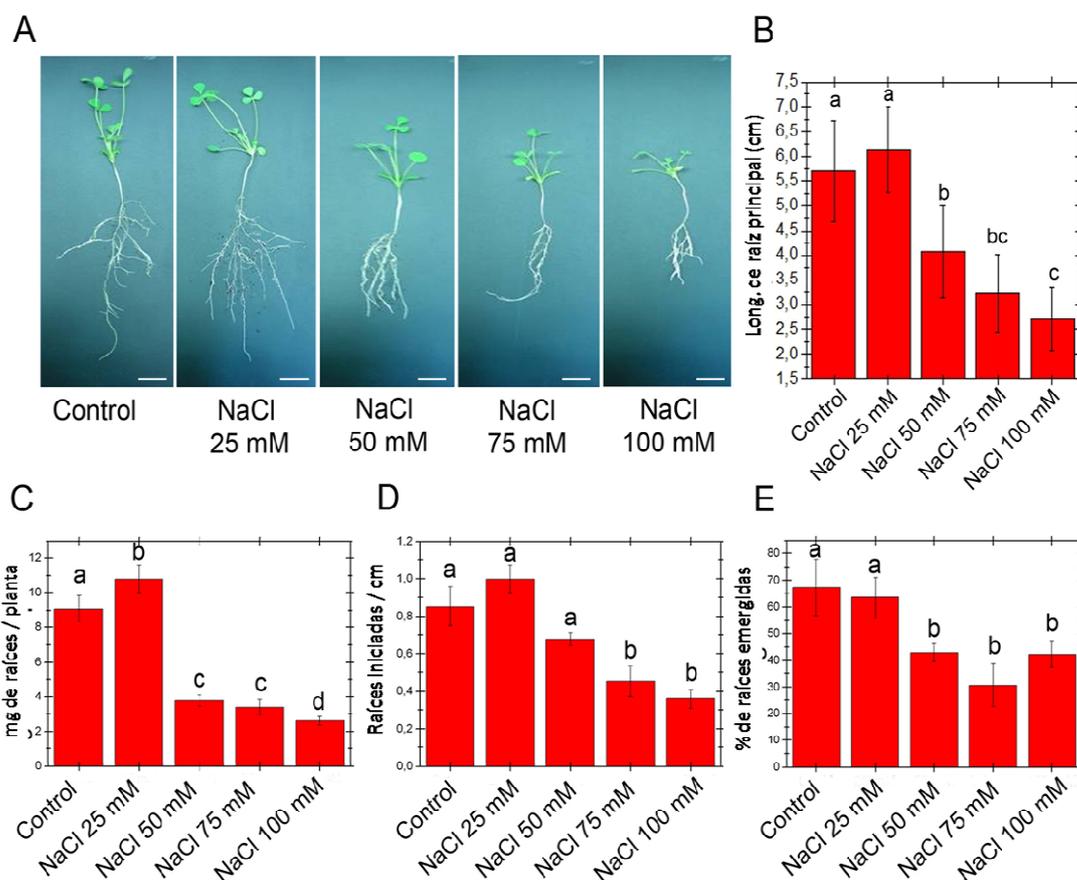


Figura 1.7. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la arquitectura radicular de *M. truncatula*. A) Ejemplo representativo de plantas del genotipo A17 crecidas durante 3 semanas en una mezcla de arena y perlita en invernadero, regadas con medio Fahræus con las concentraciones de NaCl indicadas en los respectivos ejes x de los gráficos. La línea de escala representa 1 cm. De B a E se refiere a los grupos de plantas representados en (A). B) Largo de la raíz principal; C) Peso seco total; D) Raíces laterales iniciadas totales por cm (cuantificadas desde 4 células en adelante); E) Porcentaje de raíces laterales emergidas (relativas al número total de iniciadas). En todos los casos, $n > 20$ por condición, Test Kruskal-Wallis, $P < 0,05$. Las barras de error representan las desviaciones estándar producidas entre 3 replicados biológicos.

Por el contrario, las concentraciones iguales o mayores a 50 mM causaron un severo efecto de estrés en el crecimiento y desarrollo de las raíces (Figura 1.7A, B y C). Cuando la concentración de NaCl fue de 50 mM, el estrés afectó la emergencia, ya que el número de raíces laterales iniciadas por cm no difirió significativamente del de los grupos utilizados como controles (Figura 1.7D y E). Cuando la concentración de sal fue mayor (75 y 100 mM), no sólo se vio afectada la emergencia de las raíces laterales sino también la iniciación de las mismas (Figura 1.7D y E). El uso del parámetro “porcentaje de raíces emergidas” es el más adecuado para el análisis de la arquitectura radicular ya que nos permite independizarnos del cambio sufrido en el número de raíces emergentes por la variación del número de raíces iniciadas.

El estrés y el ABA inducen la expresión de *MtHB1*

Con el propósito de entender y analizar las vías de respuesta al estrés que afectan las funciones normales de los meristemas de la raíz, se llevó a cabo un análisis transcripcional a gran escala que permitiera la identificación de aquellos FTs cuya expresión se viera modificada por un tratamiento de una hora con una solución de NaCl 100 mM. De este análisis transcriptómico resultó que la expresión del FT HD1374 (al que ahora llamamos MtHB1, por *M. truncatula* HOMEOBOX 1) se inducía notoriamente por el estrés salino causado en el ápice de la raíz (Gruber y col., 2009). MtHB1 pertenece a la familia HD-Zip de factores de transcripción, y puede ser clasificado en la subfamilia I. La construcción de un árbol filogenético con todas las proteínas miembros de las subfamilia HD-Zip I de Arabidopsis incluyendo a la única copia existente de MtHB1, mostró que los genes parálogos *AtHB7* y *12* son sus homólogos en esta otra planta modelo. El alineamiento de las secuencias proteicas permitió inferir que MtHB1, *AtHB7* y *12* presentan una alta homología de secuencia tanto dentro como fuera del dominio HD-Zip (Figura 1.8B). A su vez, la estructura génica de *MtHB1* (Figura 1.8A) tiene una distribución de exones - intrones conservada con sus genes homólogos en Arabidopsis (Henriksson y col., 2005).

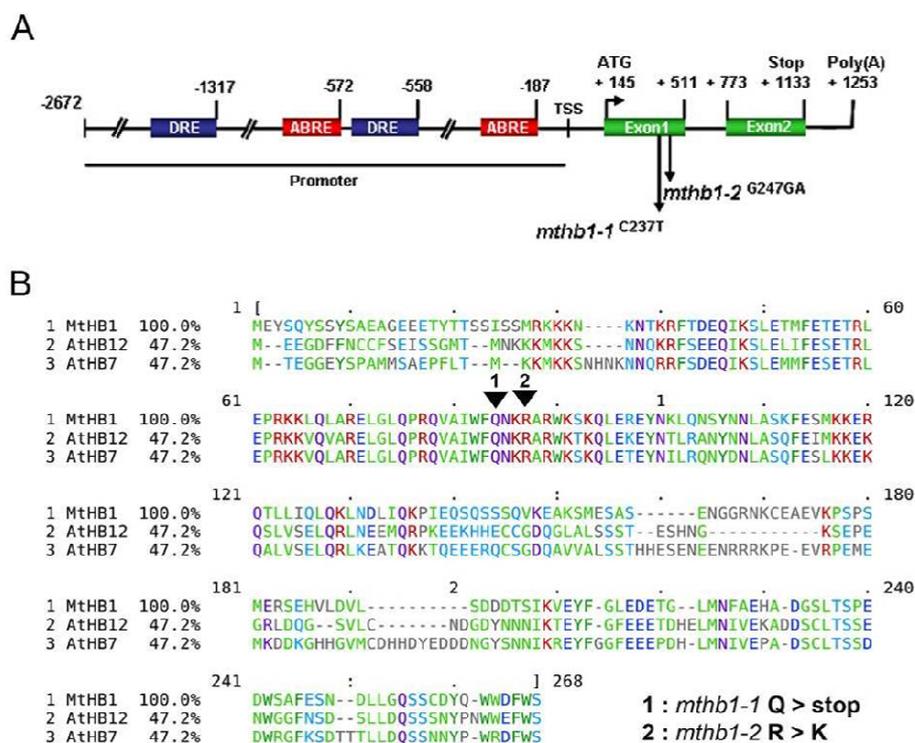


Figura 1.8. *MtHB1* codifica un FT de la familia HD-Zip I. A) Estructura génica de *MtHB1*, con las posiciones indicadas de los Elementos de Respuesta a ABA (ABREs) y los Elementos de Respuesta a Sequía (DREs). TSS: sitio de inicio de la transcripción. Las flechas indican la posición de las mutaciones de las plantas mutantes *mthb1-1* y *-2*, obtenidas por TILLING y la sustitución correspondiente de nucleótidos. Los números están indicados respecto al TSS. B) Alineamiento de proteínas entre MtHB1 y AtHB7 y 12 de Arabidopsis. La identidad está indicada a la izquierda así como el porcentaje relativo a la secuencia de MtHB1 usada como referencia. El alineamiento fue realizado con el programa MAFFT 6.0 (Kato y Toh, 2008) y visualizado con la herramienta MView (Brown y col., 1998). Los colores indican las propiedades químicas comunes entre aminoácidos. Las flechas muestran dónde se ubican las mutaciones de las líneas *mthb1-1* y *-2*, y las modificaciones de las secuencias están indicadas debajo del alineamiento.

La secuencia promotora de *MtHB1* presenta dos elementos de respuesta a ABA (ABRE, del inglés *ABA Responsive Element*) y dos de respuesta a sequía (DRE, del inglés *Drought Responsive Element*) (Figura 1.9A), también presentes en los promotores de sus

genes homólogos de *Arabidopsis*, *AtHB7* y *12*, y de girasol, *HaHB4*. De hecho, se ha demostrado que estos tres genes de gran homología con *MtHB1* son inducidos por ABA y estrés, además de que son expresados en raíces (Söderman y col., 1996; Dezar y col., 2005; Manavella y col., 2008a). Sin embargo, el rol que cumplen en estos órganos continúa siendo incierto. Con el objeto de analizar la expresión de *MtHB1* en raíces en respuesta a ABA y a estrés salino se trataron plantas de 21 días durante 3 h con ABA 10 y 100 μM , NaCl 25 y 100 mM o manitol 200 mM. Se extrajo ARN total de las raíces de estas plantas y se determinó el nivel de expresión en las muestras aplicando la técnica de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados que se muestran en la Figura 1.9 indicaron que la transcripción de *MtHB1* se induce débilmente por bajas concentraciones de ABA o NaCl y fuertemente por altas concentraciones de estos mismos compuestos y por manitol (Figura 1.9).

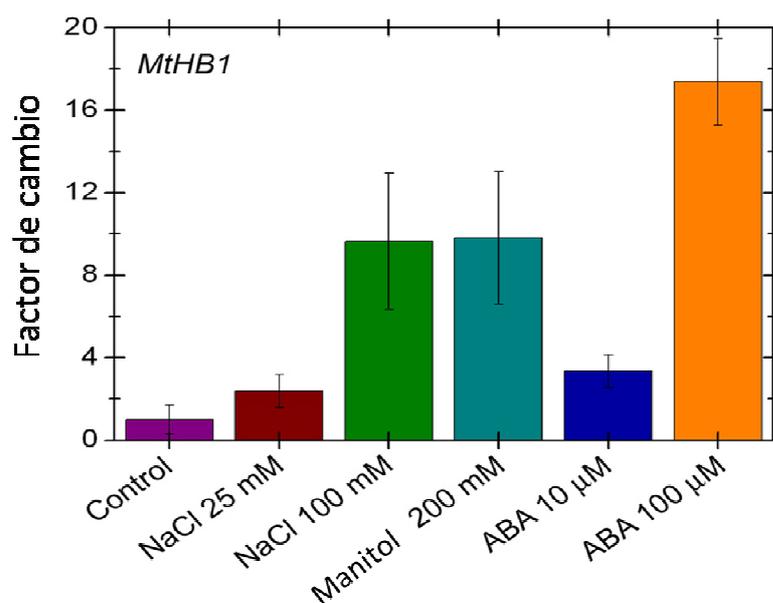


Figura 1.9. La expresión de *MtHB1* se induce por ABA y estrés. La cuantificación por PCR en tiempo real muestra la respuesta de *MtHB1* a diferentes concentraciones de NaCl, ABA y manitol. Las barras indican el factor de inducción en escala lineal, normalizado con un control (sin tratamiento). Los niveles de expresión del gen *H3L* fueron utilizados como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de 4 replicados biológicos.

MtHB1 regula la arquitectura radicular de *M. truncatula*: el efecto de su expresión constitutiva

Los FTs se expresan normalmente en muy bajos niveles, hecho que dificulta los estudios funcionales. La estrategia de sobre expresarlos por transformación ha sido de gran utilidad en este sentido. Con el propósito de dilucidar cuál es el rol de MtHB1 en las raíces en respuesta al estrés, decidimos hacer uso de las técnicas de transformación disponibles y expresarlo en forma constitutiva en raíces de *M. truncatula*. Aislamos el ADNc de *MtHB1* a partir del producto de la transcripción reversa realizada sobre ARN extraído de raíces totales tratadas con sal, para asegurarnos un alto nivel de transcripto. El ADNc fue clonado en el vector binario pMF2 (Merchan y col., 2007) en el que se encuentra bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La construcción resultante fue utilizada para transformar bacterias de la cepa *Agrobacterium rhizogenes*, con las que se transformaron raíces de *M. truncatula* siguiendo la técnica descrita por Boisson-Dernier y col. (2001). En paralelo se transformaron raíces con el vector pMF2 vacío para ser utilizadas como controles. De esta manera, obtuvimos plantas con una parte aérea salvaje y un sistema radicular transgénico, con una alta eficiencia de transformación y en un tiempo razonablemente corto, de apenas 3 a 5 semanas.

La sobre expresión de *MtHB1* en las raíces modificó el sistema radicular, dando lugar a una raíz principal más larga de lo normal y a un peso seco total de la raíz significativamente menor (Figura 1.10A y B).

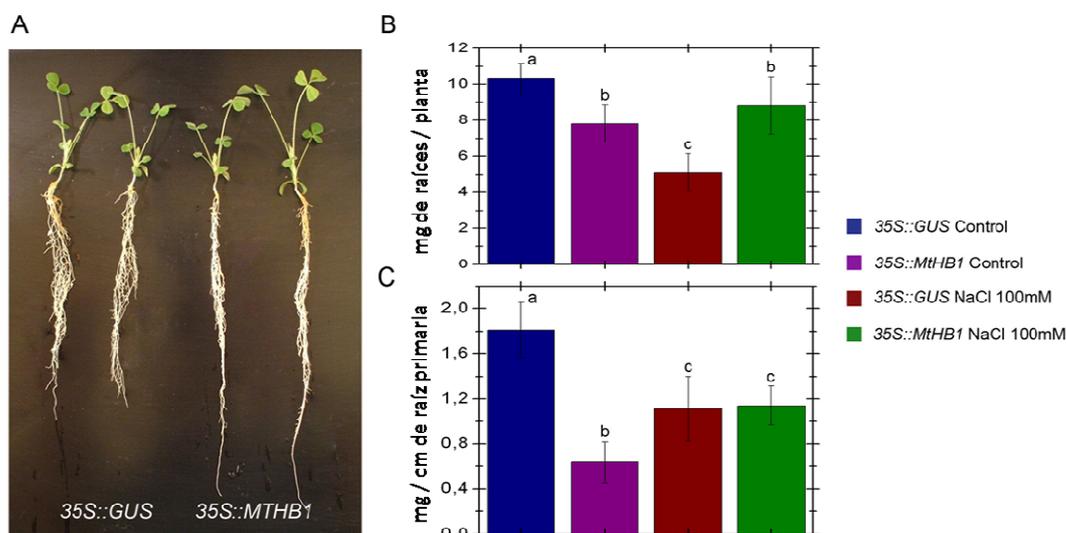


Figura 1.10. Las plantas que sobre expresan *MtHB1* muestran una arquitectura radicular alterada. A) Dos plantas representativas de *M. truncatula* transformadas con las construcciones *35S::GUS* y *35S::MtHB1*, luego de 4 semanas de crecimiento en una mezcla de arena y perlita en el invernadero. B-C) El peso seco de la raíz por planta (B) y por cm de raíz principal (C) fue cuantificado en condiciones normales y en estrés salino (NaCl 100 mM). Las letras indican valores significativamente diferentes entre los grupos (Test Kruskal-Wallis $p < 0,05$; $n > 20$ en todos los casos).

La diferencia en la arquitectura de la raíz se hizo evidente cuando se consideró el valor del peso seco por cm de raíz principal (Figura 1.10C), demostrando que la distribución de la masa radicular había sido alterada. También analizamos el efecto de la sal en las plantas utilizadas como controles y en aquellas que sobre expresan *MtHB1*. Sorprendentemente, la masa total de las raíces *35S::MtHB1* no se vio afectada significativamente por el estrés salino (Figura 1.10B). El efecto de la expresión ectópica del gen en condiciones control sobre el peso seco de la raíz fue comparable al causado por la exposición de las plantas salvajes a una solución de NaCl 50 mM (Figura 1.7B). Por este motivo nos propusimos determinar si *MtHB1* estaría participando en la formación de raíces laterales y si así fuera, de qué manera.

MtHB1 regula la emergencia de las raíces laterales y mantiene el meristema: caracterización de las plantas mutantes *mthb1*

Para alcanzar una comprensión más profunda de la función de *MtHB1* en respuesta al estrés y en la determinación de la arquitectura de raíces utilizamos dos líneas mutantes independientes de la plataforma TILLING de John Innes Centre, Inglaterra (Le Signor y col., 2009). El alelo *mthb1-1*, correspondiente a una línea homocigota, presenta un codón de STOP en la tercera hélice del HD, lo cual impediría totalmente la interacción de la proteína truncada con el ADN. El segundo alelo (*mthb1-2*), proveniente de una línea heterocigota, exhibe una mutación puntual en la hélice III, imposibilitando a la proteína mutada de interactuar de manera óptima con su secuencia blanco (Figura 1.9).

En primera instancia cuantificamos, con la ayuda de un microscopio óptico, el número total de raíces iniciadas y de aquellas emergidas en el sistema radicular. Todas las raíces iniciadas fueron incluidas en el conteo, desde la fase de cuatro células en adelante. Consideramos emergentes a las raíces laterales sólo si ya habían roto la capa celular de la epidermis, contemplando para el conteo total de iniciadas también a aquellas que aún no lo hicieron (acorde a las fases II a VII en *Arabidopsis*, Malamy y Benfey, 1997). Este análisis permitió ver que el número de primordios iniciados por cm no se afecta en las plantas *mthb1-1*, aunque la raíz principal sí es significativamente más corta (Figura 1.11A y B). Sin embargo, el número de raíces laterales ya emergidas por cm aumentó casi un 30 %.

Al realizar un análisis de la segregación del alelo *mthb1-2*, determinamos que las líneas homocigotas obtenidas también exhibían un incremento en la cantidad de raíces laterales emergidas (Figura 1.11C y E).

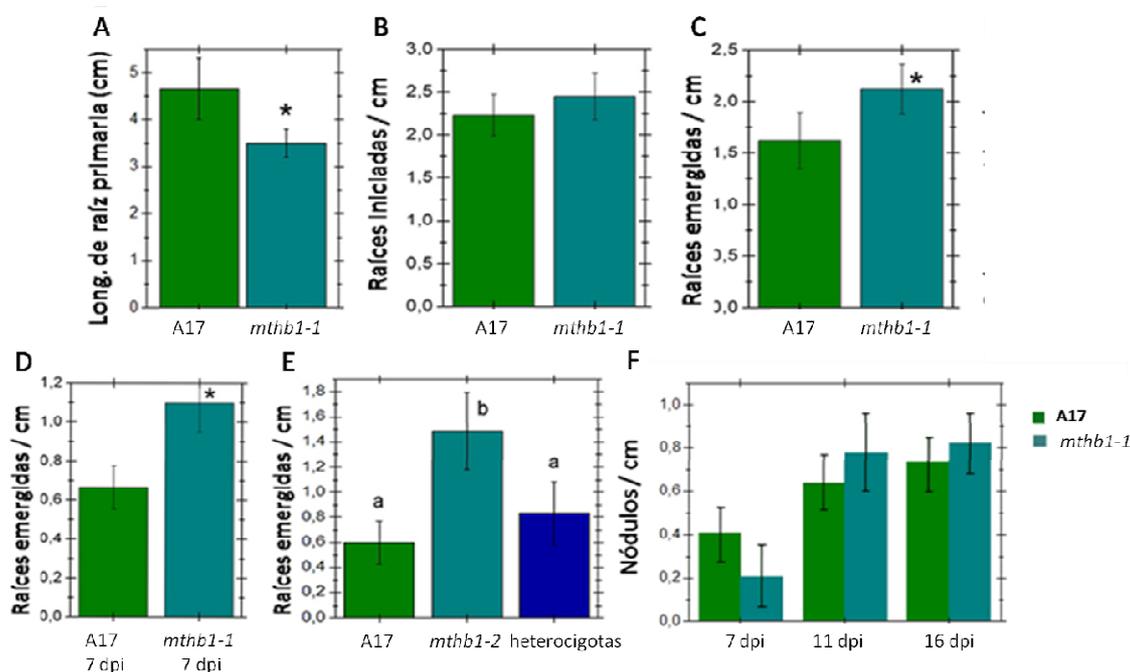


Figura 1.11. Las plantas mutantes *mthb1* presentan un incremento en la emergencia de las raíces laterales. A) Largo de la raíz principal de plantas salvajes (genotipo A17) y de las mutantes *mthb1-1*. B-D) Cuantificación de las raíces laterales iniciadas (B) o emergidas por cm de raíz principal (C) para ambos genotipos, en condiciones normales (B y C) o en condiciones simbióticas con *Sinorhizobium melitoli* en un medio pobre en nitrógeno (D). De A a D, los asteriscos indican valores promedio significativamente diferentes entre A17 y *mthb1-1* (Test t de Student, $p < 0,01$, y las barras de error representan la desviación estándar entre los replicados biológicos). E) Análisis de la segregación de la mutación *mthb1-2*. Se determinó el número de raíces laterales emergidas por cm en plantas homocigotas mutantes ($n = 12$) y salvajes ($n = 10$), así como heterocigotas ($n = 20$), de 3 semanas. Las letras representan valores significativamente diferentes entre los grupos (Test Kruskal-Wallis $P < 0,05$). F) Número de nódulos por cm de raíz principal a los 0, 7, 11 y 16 días post inoculación (dpi) con *Sinorhizobium melitoli*. Las barras de error representan la desviación estándar entre replicados biológicos ($n > 30$ y el Test t de Student dio $p > 0,05$ en todos los casos).

Considerando que las plantas leguminosas tienen la capacidad de interactuar con bacterias del suelo, nos dispusimos a analizar el comportamiento de las raíces de plantas mutantes en *MtHB1* en condiciones simbióticas. Siete días después de la inoculación (dpi, días post inoculación) con *Sinorhizobium melitoli*, las plantas *mthb1-1* resultaron tener raíces más cortas y un 40 % más de raíces laterales emergidas que las plantas salvajes. Esta diferencia fue aún más pronunciada que en presencia de nitrógeno combinado (Figura 1.11D). El número de nódulos generados por cm de raíz fue igual en las plantas salvajes y mutantes (Figura 1.11F). Además, la morfología y desarrollo de los mismos son normales.

MtHB1 es un actor fundamental en el efecto que ejerce el medioambiente sobre la emergencia de raíces laterales de *Medicago truncatula*

Con el fin de profundizar la caracterización funcional de MtHB1, decidimos analizar el efecto del NaCl y del ABA en el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas mutantes *mthb1*. Determinamos la densidad del total de raíces laterales iniciadas, así como el porcentaje de las emergidas en plantas mutantes *mthb1-1* y salvajes crecidas durante 6 días en diferentes concentraciones de NaCl o ABA (Figura 1.12). Como fue mencionado anteriormente, en condiciones normales las plantas mutantes exhiben un número mayor de raíces emergidas, y una cantidad normal de raíces iniciadas. La iniciación de raíces laterales aumentó en ambos genotipos por la aplicación de ABA 10 μ M, tal como fuera descrito para las plantas salvajes (Liang y col., 2007). El efecto de ABA 50 μ M, NaCl 25, 50 y 75 mM sobre la iniciación de raíces laterales fue similar y comparable entre las plantas *mthb1-1* y las salvajes (Figura 1.12A). Sin embargo, el efecto en la emergencia de las raíces laterales fue notablemente diferente: mientras el porcentaje de raíces laterales emergidas no se alteró frente a ninguna de las condiciones ensayadas en las plantas mutantes; las plantas salvajes mostraron un detrimento significativo ante ABA 50 μ M, NaCl 50 y 75 mM (Figura 1.12B). Esto sugiere que MtHB1 participa en las vías de control de la emergencia pero no de la iniciación de las raíces laterales. La Figura 1.12C muestra ejemplares representativos de plantas salvajes y *mthb1-1* crecidas en diferentes condiciones.

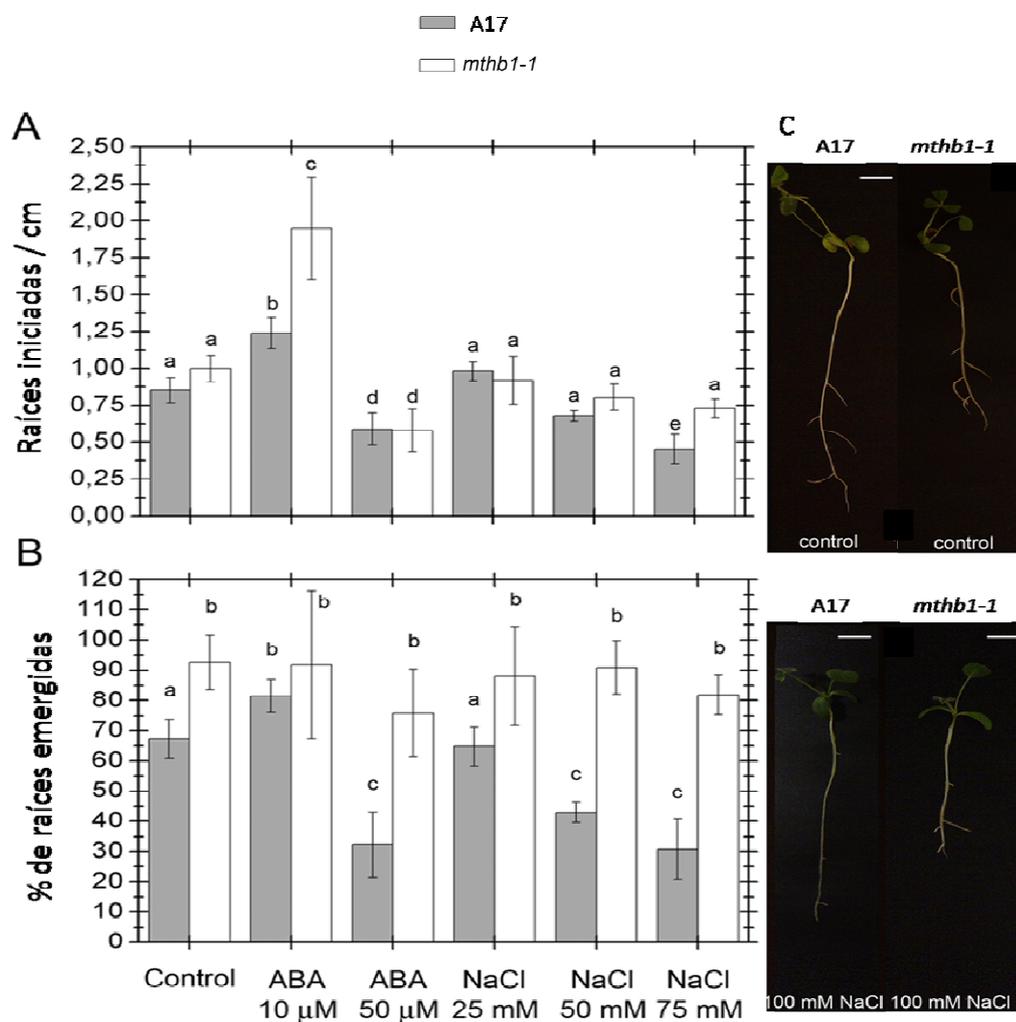


Figura 1.12. MthB1 controla la emergencia de las raíces laterales en *M. truncatula*. A-B) Número de raíces iniciadas totales por cm (A) y porcentaje de raíces emergidas (B), relativo al valor de (A); en plantas salvajes (A17) y *mthb1-1*, en presencia de diferentes concentraciones de ABA y NaCl. En todos los tratamientos, el porcentaje de emergencia de las plantas *mthb1-1* fue similar. C) Ejemplares representativos de plantas A17 y *mthb1-1* de 10 días mostrando el efecto del tratamiento prolongado con NaCl 100 mM. La línea de escala representa 1 cm.

El análisis microscópico de estas raíces luego de una tinción con lugol mostró que en condiciones normales la morfología de la raíz principal y de las raíces laterales era similar en plantas salvajes y en las mutantes *mthb1-1* (Figura 1.13). Notablemente, este análisis reveló una desorganización del mersistema de la raíz principal en las plantas mutantes en respuesta a NaCl 100 mM.

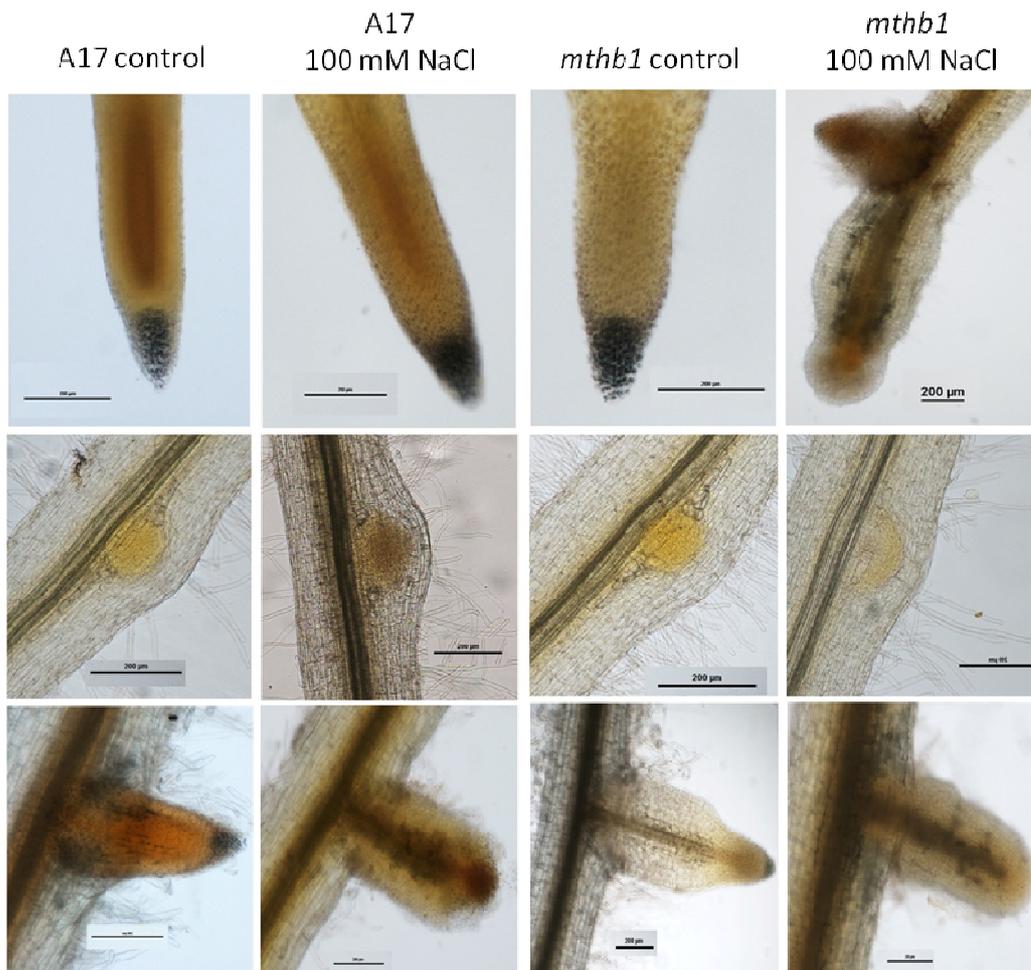


Figura 1.13. Las plantas mutantes *mthb1-1* sufren un defecto en la organización del ápice radicular en condiciones de estrés salino. Comparación de ápices y raíces laterales en formación luego de la tinción con lugol. Cabe destacar la desorganización sufrida por ambos genotipos en el ápice de la raíz lateral en condiciones de estrés. Todas las plantas fueron crecidas durante 10 días en medio Farhæus agarizado suplementado o no con NaCl 100 mM. Las líneas de escala representan 200 μm .

Los cortes histológicos de estas raíces ayudaron a determinar que este defecto consistía en la pérdida de la caliptra y de la acumulación de amiloplastos (Figura 1.14). La desorganización celular estuvo acompañada de la presencia de pelos radiculares en la epidermis del ápice (Figura 1.14). Si bien en condiciones normales la emergencia de las raíces laterales está alterada en las plantas *mthb1-1*, el énfasis del fenotipo en respuesta a estrés podría deberse, al menos en parte, a la inviabilidad del meristema apical en estas condiciones.

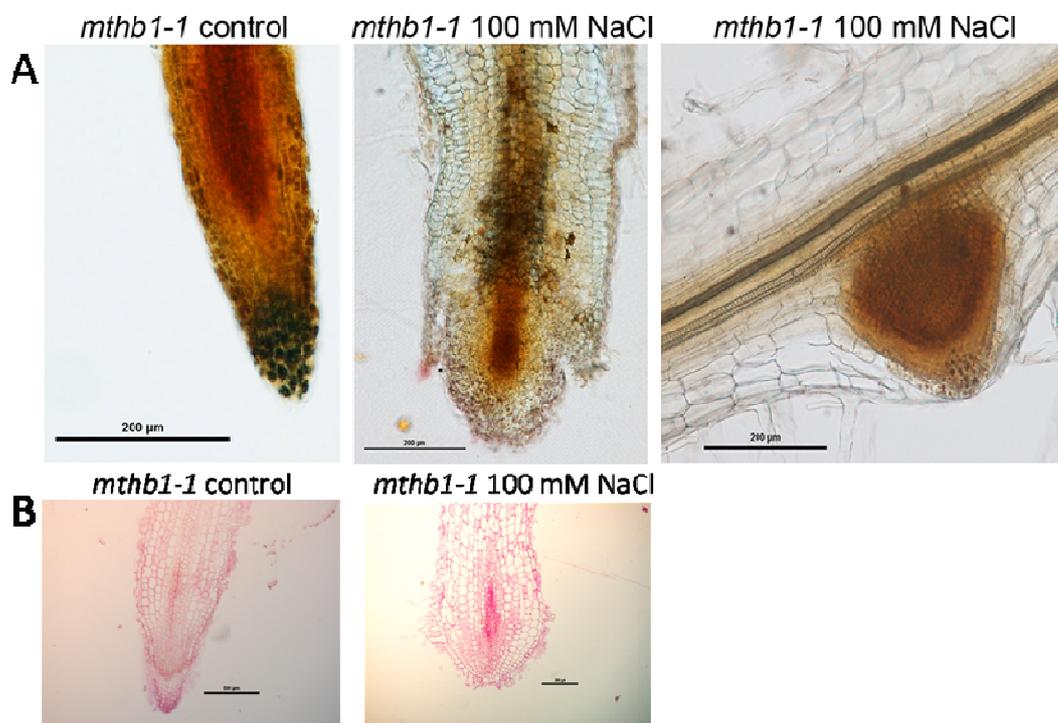


Figura 1.14. Análisis histológico de las raíces *mthb1-1* en condiciones normales y en estrés salino. A) Secciones longitudinales de 50 µm de espesor de las raíces teñidas con lugol. Las mutantes *mthb1-1* muestran un defecto en la organización del ápice. Las líneas de escala representan 200 µm. B) Secciones longitudinales de 5 µm de espesor, en las que se puede apreciar que en condiciones de estrés las raíces *mthb1-1* carecen de cofia, sufren de un ensanchamiento de la región meristemática y su epidermis presenta pelos radiculares.

MtHB1 reprime la expresión de un factor de transcripción de la familia LBD, regulado por las auxinas

Con el propósito de comprender los mecanismos moleculares mediante los cuales MtHB1 regula la emergencia de las raíces laterales, nos dispusimos a identificar los genes que actúan como blancos directos de este FT. La primera estrategia abordada para este fin fue la de determinar la secuencia de ADN unida con mayor afinidad por MtHB1 *in vitro*. Clonamos la región codificante del dominio HD-Zip de MtHB1 en el vector de expresión pGEX-3X en fase con el gen que codifica la proteína de fusión GST de *Schistosoma japonicum* (Kaelin y col., 1992). Expresamos la proteína recombinante en bacterias y la purificamos por cromatografía de afinidad. Basados en los informes de la literatura acerca de la caracterización bioquímica de la interacción con el ADN de otros miembros de la subfamilia HD-Zip I (Söderman y col., 1996; Palena y col., 1998), comprobamos mediante ensayos de retardo en geles que MtHB1 reconoce con máxima afinidad *in vitro* a la secuencia CAATNATTG (Figura 1.15).

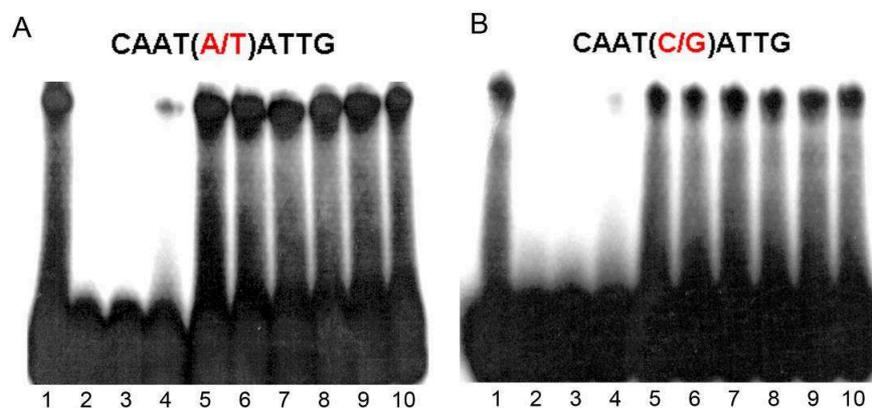


Figura 1.15. Especificidad de unión al ADN *in vitro* de la proteína recombinante GST-dominio de unión de MtHB1. A-B) Geles de retardo representativos de la unión de GST-MtHB1 a las secuencias marcadas radioactivamente (A) CAAT(C/G)ATTG o (B) CAAT(A/T)ATTG. Esta secuencia de ADN compitió con 20 veces más de oligonucleótidos sin marcar de las siguientes secuencias relacionadas: CAAT(A/T)ATTG en la calle 2, CAAT(C/G)ATTG en la calle 3, y una selección de secuencias alteradas: (4) TAAT(A/T)ATTA, (5) CAGT(A/T)ACTG, (6) CATT(A/T)AATG, (7) CAAA(A/T)TTTG, (8) CAAC(A/T)GTTG, (9) CGAT(A/T)ATCG, y (10) CAGT(G/C)ACTG.

Asumiendo que la secuencia reconocida *in vitro* por MthB1 es la misma que reconoce *in vivo*, nos propusimos analizar las regiones promotoras de aquellos genes co-regulados con *MtHB1* en respuesta al estrés salino en búsqueda del pseudopalíndromo. Utilizamos una lista de 339 genes cuya expresión fue inducida o reprimida en ápices de raíces tratadas durante una hora con NaCl 100 mM (| Factor de Cambio | >1,5; Valor p ajustado < 0,05; Gruber y col., 2009). Para esta búsqueda se consideraron los 2000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (primer ATG del marco de lectura) de cada gen, haciendo uso de la herramienta bioinformática REMORA Workflow [GetAndScanPromoterRegionsFromAListOfMedicagoIDsToUniqueIDs](#) desarrollada especialmente para este trabajo por Marion Verdenaud y Sébastien Carrere del Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (INRA Toulouse, Francia), e incluida en la página <http://www.legoo.org/> (Carrere y Gouzy, 2006). Doce genes de los 339 regulados por sal en las raíces tenían la secuencia CAATNATTG en sus promotores (Tabla 1.1). Entre ellos, elegimos los cuatro cuyos niveles de transcripción variaron más de 10 veces en la condición estresante para analizar su comportamiento en las raíces que sobre expresan a *MtHB1*. De estos cuatro, tres presentan inducción y uno, represión.

NA	TC MTGI9	FC	valor p	Descripción
AC146572_11.4	BF633107	34,24	2,00E-05	Represor transcripcional de tipo ZIM
AC137079_35.5	TC120392	20,39	2,00E-05	Citocromo P450 mono oxigenasa
AC140022_5.4	TC123683	18,26	5,00E-05	Inhibidor de tripsina de tipo KUNITZ
AC174349_18.5	TC128878	5,19	< 1,00E-05	Desconocido
AC122171_17.5	TC115307	3,45	0,00051	FT de tipo MYB
AC157374_21.5	TC122666	3,23	< 1,00E-05	Desconocido
AC174290_18.4	TC139269	2,00	0,00044	FT de tipo GRAS
CR962130_5.4	TC116230	2,00	0,00057	Desconocido
AC147741_18.4	TC114896	1,86	2,00E-05	Desconocido
AC146551_7.4	TC121747	-13,03	< 1,00E-05	MtLBD1 / FT de tipo LOB
AC170580_6.4	TC127753	-3,37	1,00E-05	Desconocido
AC146553_56.5	TC127899	-1,77	6,00E-05	Transportador de azúcares

Tabla 1.1. Lista de los potenciales genes blanco de MthB1. Genes co-regulados con *MtHB1* por estrés salino en el ápice de la raíz (Gruber y col., 2009) que contienen una caja CAATNATTG en sus regiones promotoras (definidas como los 2 kb corriente arriba del ATG). NA: Número de Acceso de la región genómica (base de datos NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>); TC: Consenso Tentativo basado en TIGR9

(<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>). Aquellos genes mejor inducidos o reprimidos (Factor de Cambio FC > 10) se resaltan en rojo y azul, respectivamente.

Prosiguiendo este estudio, se midieron los niveles transcripcionales de estos cuatro genes en raíces transformadas con la construcción *35S:MtHB1*. De estos cuatro genes, sólo el que se encontraba reprimido en el análisis transcriptómico presentaba un comportamiento similar en las raíces transformadas en condiciones basales, indicando la posibilidad de ser un blanco directo de MtHB1. La Figura 1.16 ilustra este resultado: la inducción o represión de la expresión de los cuatro genes en condiciones normales en las raíces *35S:MtHB1*.

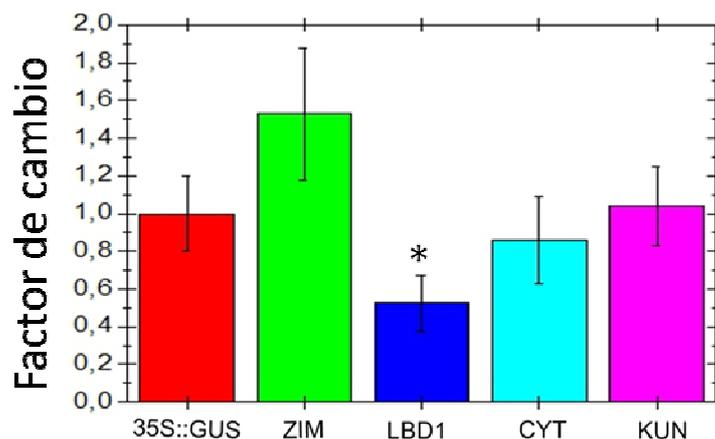


Figura 1.16. Análisis de la expresión por PCR en tiempo real de los cuatro genes candidatos a ser blancos directos de MtHB1 en las raíces que sobre expresan este FT. ZIM: Represor transcripcional de respuesta al jasmonato del tipo ZIM; LBD1: FT del tipo LOB; CYT: P450 monooxigenasa; KUN: KNITZ tipo ST1. Las barras de error representan la desviación estándar de los replicados biológicos. El asterisco indica una diferencia significativa con el valor control usado como referencia en cada caso (*35S::GUS*; Test t de Student $p < 0,01$).

MtLBD1 codifica un FT del tipo LOB (del inglés, LATERAL ORGAN BOUNDARIES; Husbands y col., 2007), y lo llamamos *MtLBD1* (*M. truncatula* LOB BINDING DOMAIN - *Dominio de Unión*, en inglés - *I*). Para corroborar este resultado que indicaba que este gen podía ser un blanco directo de MtHB1 analizamos el

comportamiento *MtLBD1* en las raíces de las plantas *mthb1-1*, y observamos que su nivel de expresión basal era significativamente superior al de las plantas salvajes (Figura 1.17A). Se transformaron entonces raíces de plantas mutantes *mthb1-1* con la construcción *35S::MtHB1*. La expresión constitutiva de *MtHB1* en estas raíces *mthb1-1* restableció los niveles normales de transcripto de *MtLBD1* (Figura 1.17B). El comportamiento molecular de este gen en los tres genotipos indicó que se encuentra corriente abajo de *MtHB1* en la cascada de señalización, y aportó evidencias fuertes apoyando la hipótesis de que podría ser su blanco directo.

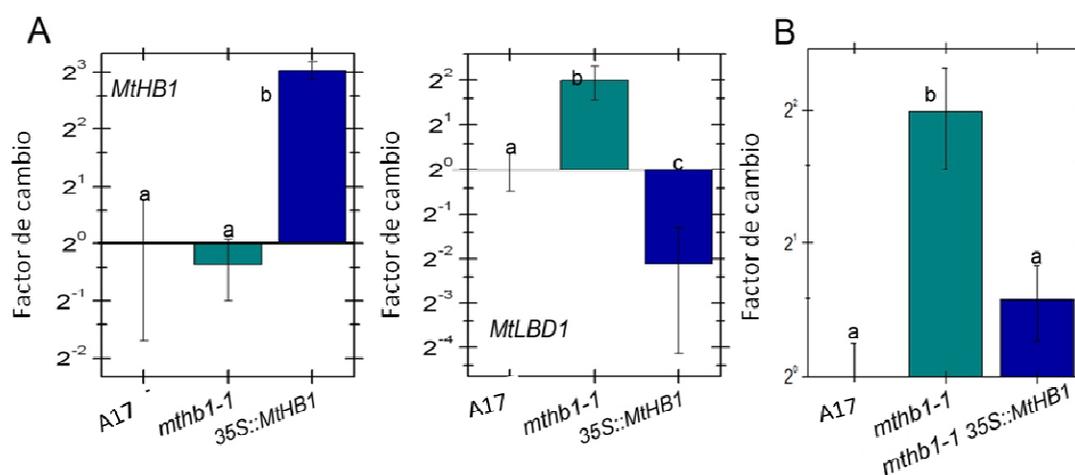


Figura 1.17. El FT *MtLBD1* de tipo LOB es transcripcionalmente reprimido por la acción de *MtHB1*. A) Análisis cuantitativo de los niveles de expresión (por PCR en tiempo real) de *MtHB1* y *MtLBD1* en raíces de plantas salvajes, de aquellas que expresan constitutivamente *MtHB1* y de las plantas *mthb1-1*. B) Niveles relativos de expresión de *MtLBD1* en plantas salvajes y *mthb1-1* que sobre expresan o no *MtHB1*. En todos los casos el factor de inducción está representado en escala \log_2 . El gen *H3L* fue utilizado como referencia. Los valores están referidos al de las plantas salvajes, considerado como 1. Las barras de error representan la desviación estándar entre los replicados biológicos.

Los estudios realizados hasta el momento indicaron que los miembros de la familia LBD participan en la formación de raíces laterales en cereales (Liu y col., 2005) y algunos presentan una expresión inducida por auxinas en raíces de *Arabidopsis* (Okushima y col., 2005). La construcción de un árbol filogenético con miembros de las subfamilias I y II de los LBDs de *Arabidopsis* (Shuai y col., 2002) y aquellos predichos

en *M. truncatula*, muestra que MtLBD1 se encuentra en medio de ambas subfamilias, dificultando la asignación de un gen homólogo con claridad (Figura 1.18).

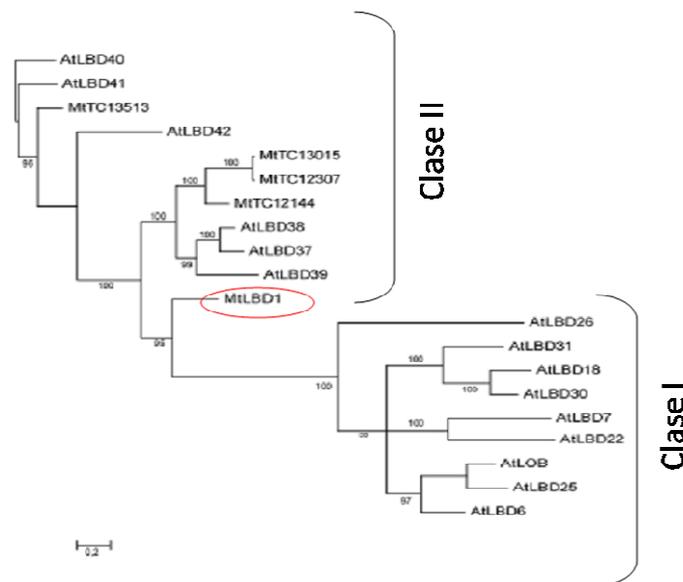


Figura 1.18. Árbol filogenético de algunos FTs del tipo LOB de *Arabidopsis* y todos aquellos predichos en *M. truncatula*. Reconstrucción filogenética usando un algoritmo de inferencia Bayesiana implementado por el programa MrBayes 3 (Huelsenbeck y col., 2001). Los números indican la probabilidad *a posteriori*. Aunque *MtLBD1* podría clasificarse dentro de la Clase I, difiere significativamente del resto de los miembros y resulta difícil asignarle un homólogo en *Arabidopsis*.

El rol descrito para los LBDs de otras especies vegetales nos planteó la posibilidad de que MtHB1 pudiera reprimir en forma directa la expresión de genes de respuesta a auxinas con el fin de regular la emergencia de las raíces laterales.

MtHB1 reprime directamente a *MtLBD1* durante la formación de las raíces laterales

La hipótesis de que MtHB1 regularía en forma directa la transcripción de *MtLBD1* llevó a determinar el patrón de expresión de ambos genes. Para ello, se amplificaron 2817 pb corriente arriba del ATG de *MtHB1* y 2000 pb del ATG de *MtLBD1* a partir de los clones BACs (del inglés, Bacterial Artificial Chromosomes) correspondientes de la región conocida del genoma de *M. truncatula* y se clonaron en el vector binario pKGWFS7 (Karimi y col., 2002) de forma tal que estas regiones

promotoras dirijan la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*. Con las construcciones obtenidas se transformaron raíces de *M. truncatula*, y se determinó el patrón de expresión gracias a la actividad de la enzima β -GLUCURONIDASA, detectada por reacción histoquímica (Figura 1.19). El *ProMtHB1* dirigió la expresión en todas las etapas de la formación de las raíces laterales. Una vez formado el meristema, la expresión se centró en el ápice de la nueva raíz. También se vio expresión en el ápice de la raíz principal, en nódulos jóvenes y en el tejido vascular de nódulos maduros (Figura 1.19A, B y 20A a D). El tratamiento de las raíces transformadas con bajas concentraciones de NaCl o ABA durante 3 horas permitió visualizar un aumento de la coloración pero no alteró el patrón de expresión observado. Las altas concentraciones (NaCl 100 mM o ABA 100 μ M) aumentaron mucho la actividad del promotor, lo que produjo una difusión del producto de degradación del X-gluc, sin cambio en la especificidad de tejido (Figura 1.20E).

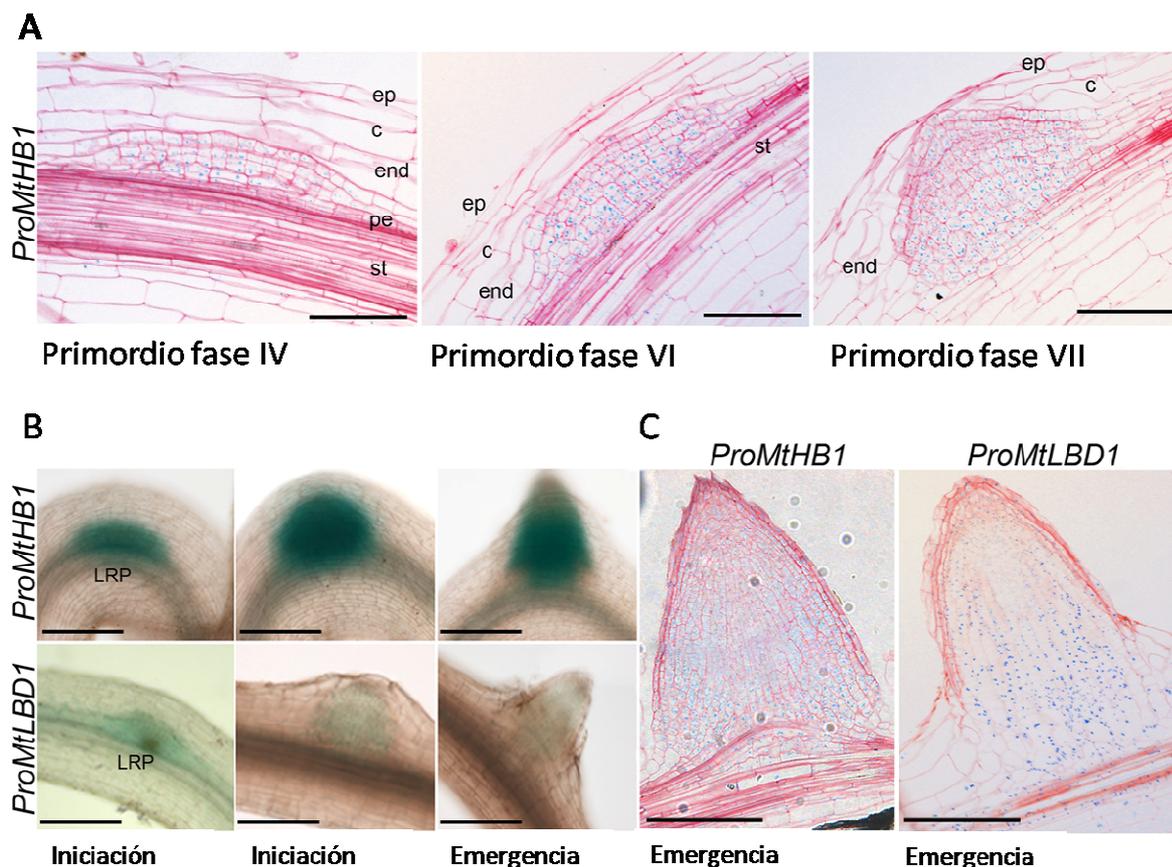


Figura 1.19. Patrón de expresión de los genes *MtHB1* y *MtLBD1* basado en el análisis de la actividad de sus regiones promotoras fusionadas al gen reportero *GUS*. A) Cortes histológicos de 5 μ m de espesor durante la formación de la raíz lateral. LRP: primordio de la raíz lateral; ep: epidermis; c: corteza; end: endodermis; pe: periciclo; st: estela. B)

Comparación entre los patrones de expresión de *MtHBI* y *MtLBD1* durante la formación de la raíz lateral. C) Cortes histológicos longitudinales de tinciones para ambos promotores, mostrando que la expresión se solapa en la base de la raíz. En (A) y (C) la línea de escala representa 125 μm y en (B) 250 μm .

A su vez, la actividad basal del *ProMtLBD1* resultó mucho más débil que la de *ProMtHBI* (Figura 1.21B). La tinción histoquímica se vio solapada en las etapas tempranas del primordio, y continuó estándolo sólo en la base de la raíz durante la emergencia. El *ProMtLBD1* no presentó actividad durante el proceso de nodulación ni en el ápice de la raíz principal.

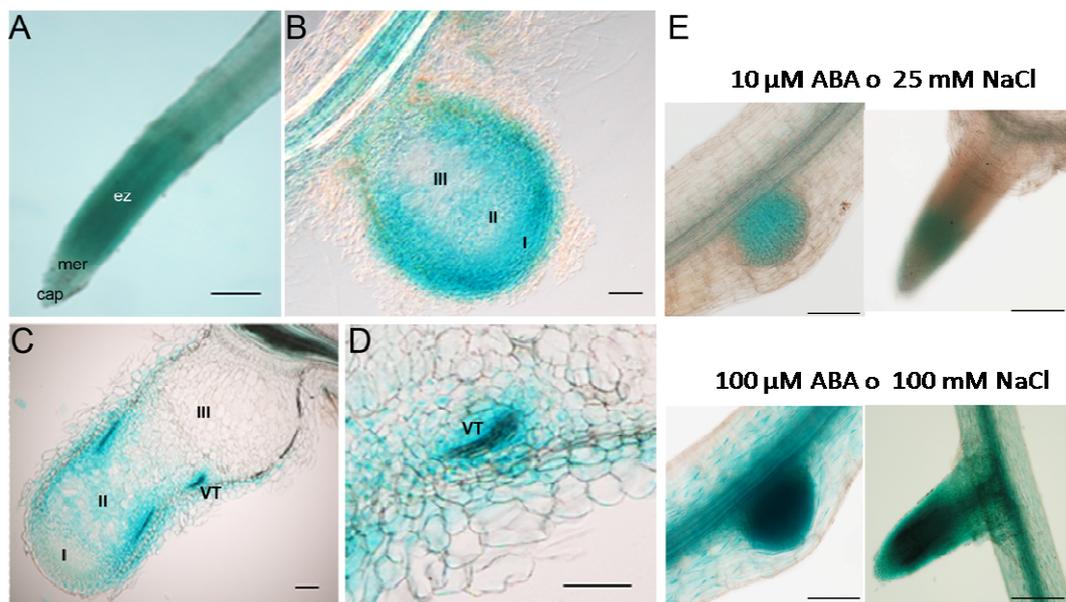


Figura 1.20. Actividad de *ProMtHBI:GUS* en el ápice de la raíz y en los nódulos simbióticos. A) *MtHBI* se expresa en el ápice. cap: caliptra; mer: mersitema; ez: zona de elongación. Las línea de escala representa 250 μm . B-C). Secciones longitudinales de nódulos jóvenes (A) y maduros (B). I: zona meristemática; II: zona de infección; III: zona de fijación (Vasse y col., 1990); vt: tejido vascular. D) Mayor detalle del nódulo maduro, mostrando el tejido vascular. Para las imágenes de los nódulos, las líneas de escala representan 300 μm . E) La actividad del *ProMtHBI* se incrementa en altas concentraciones de ABA o NaCl. Las líneas de escala representan 250 μm .

Además, la construcción *ProMtLBD1:GUS* fue utilizada para transformar raíces *mthb1-1* (Figura 1.21). En este caso la actividad del promotor fue detectada en casi todas aquellas regiones en las que normalmente se expresa *MtHB1*, incluyendo etapas tardías de la formación de la raíz lateral, y especialmente en todas las regiones meristemáticas de la raíz (Figura 1.21A). En este caso no se detectó expresión durante la nodulación.

Con el objetivo de relacionar este fenómeno con el elemento en *cis* presente en el promotor de *MtLBD1* (Figura 1.22A), generamos una construcción en la que la secuencia CAATAATTG ubicada 944 pb corriente arriba del inicio de la transcripción fue reemplazada por la secuencia CAGGATCCG (*ProMutMtLBD1:GUS*). Esta mutación anuló por completo el reconocimiento y unión *in vitro* de MtHB1 (Figura 1.22B). Al transformar raíces salvajes con esta construcción, el patrón de expresión reprodujo lo observado en raíces *mthb1* utilizando la construcción *ProMtLBD1:GUS* (Figura 1.21B) indicando de esta forma que MtHB1 no puede reconocer el elemento en *cis* mutado y unirlo para ejercer la represión. En otras palabras, el resultado observado indicó que el elemento en *cis* identificado es funcional.

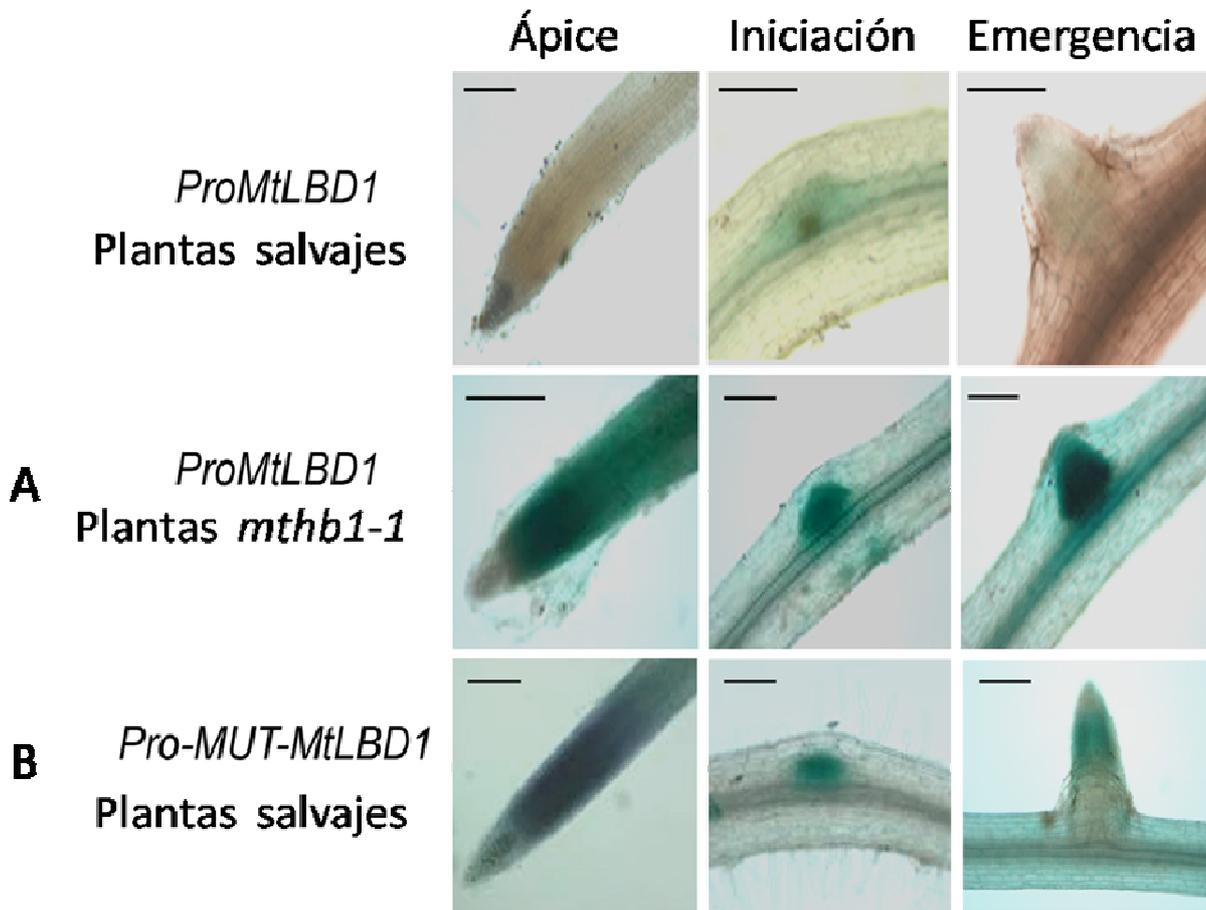


Figura 1.21. El *ProLBD1* contiene un elemento *cis* necesario para la regulación por MtHB1. Análisis de la actividad del *ProLBD1:GUS* en raíces salvajes y mutantes *mthb1-1*, así como del *ProMUT-LBD1:GUS* (con la caja CAATAATTG reemplazada por CAGGATCCG) en raíces salvajes. Las líneas de escala representan 250 μ m.

Esto implica no sólo que al no expresarse MtHB1 la actividad del *ProMtLBD1* deja de ser regulada, sino que dicha desregulación está a su vez asociada a la funcionalidad del elemento *cis* reconocido típicamente por los FTs de la familia HD-Zip I. En su conjunto, los resultados sugirieron que en condiciones normales, MtHB1 reprimiría en forma directa la transcripción de *MtLBD1* en varias etapas de la formación de raíces laterales.

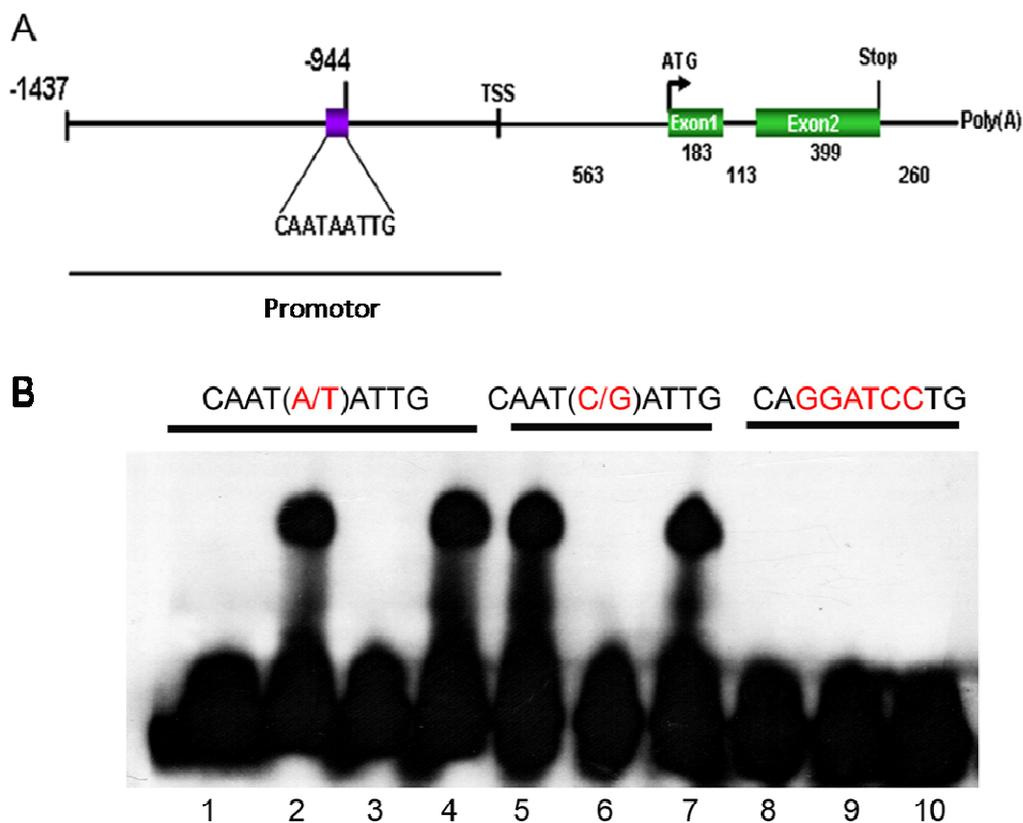


Figura 1.22. El elemento *cis* reconocido por MtHB1 en el promotor de *MtLBD1*. A) Esquema de la región promotora y la estructura génica de *MtLBD1*. TSS: sitio de inicio de la transcripción al que se refieren las posiciones indicadas. B) Gel de retardo de competencia que muestra que la mutagénesis dirigida de la caja CAATAATTG anula su reconocimiento por MtHB1 *in vitro*. Oligonucleótidos marcados radioactivamente: CAAT(A/T)ATTG (calles 1 a 4); CAAT(C/G)ATTG (calles 5 a 7); CAGGATCCG (calles 8 a 10). La unión fue competida con una concentración 20 veces mayor de oligonucleótidos con las secuencias: CAAT(A/T)ATTG (calles 6 y 9); CAAT(C/G)ATTG (calles 3 y 10); CAGGATCCG (calles 4 y 7).

Si bien las evidencias experimentales obtenidas hasta este momento indicaban con vehemencia que existía una regulación directa de *MtLBD1* por MtHB1, no era posible aseverar que *in vivo* tuviera lugar una interacción física entre el FT y el promotor de *MtLBD1*. Para constatarlo decidimos llevar a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR. Para tal fin, hicimos una construcción génica que contiene al promotor de *MtHB1*, seguido de su ADNc y, corriente abajo y en fase, una secuencia que codifica una serie de 2 Hemoaglutininas

(2xHA), reconocidas por anticuerpos comerciales (*ProMtHB1:MtHB1:2xHA*). Con esta construcción se transformaron raíces de *M. truncatula*, que fueron tratadas durante una hora con NaCl 100 mM. El uso del promotor propio en lugar de uno constitutivo (por ejemplo, el promotor 35S) recrea un escenario molecular semejante al natural. A su vez, el uso de una cola de 2 x HA para ser reconocida por los anticuerpos evita el riesgo de un reconocimiento cruzado por los anticuerpos policlonales de otros FTs de la familia HD-Zip. Un ensayo de tipo *western blot* realizado sobre extractos proteicos totales demostró que los anticuerpos comerciales reconocían una proteína del tamaño esperado (aproximadamente 35 kDa) sólo en las raíces transformadas y no así en las salvajes.

Una vez corroborada la especificidad de los anticuerpos, se extrajeron los núcleos celulares de las raíces transformadas y de las salvajes utilizadas como controles. La unión de las proteínas al ADN se fijó químicamente antes de proceder a la ruptura del ADN genómico por sonicación y la inmuno-purificación de la proteína de fusión MtHB1:2xHA por cromatografía. De esta manera, se lograron purificar aquellos fragmentos de ADN que estaban siendo unidos por MtHB1 en respuesta a sal. El resultado de la PCR que se muestra en la Figura 1.23B indica que sólo en las raíces transgénicas el segmento de ADN correspondiente al promotor de *MtLBD1* ha sido purificado conjuntamente con MtHB1:2xHA. Este resultado nos permitió asegurar fehacientemente que MtHB1 reconoce *in vivo*, al menos en respuesta al estrés salino, al promotor del gen *MtLBD1* para reprimir su expresión.

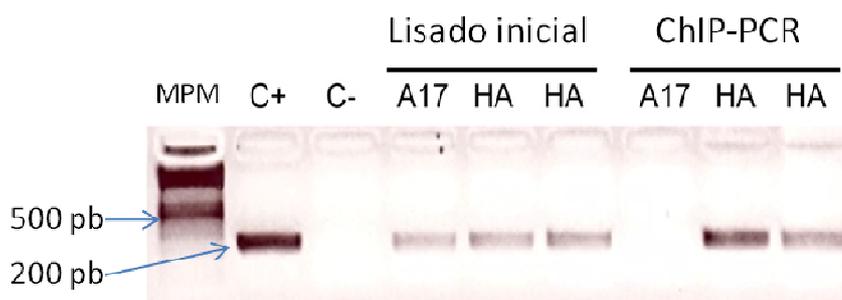


Figura 1.23. MtHB1 reconoce en forma directa al *ProMtLBD1* *in vivo*. Resultado de la del ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR (ChIP-PCR) haciendo uso de dos oligonucleótidos que amplifiquen 200 bp alrededor del elemento CAATAATTG presente en el *ProMtLBD1*. La Figura muestra una electroforesis en gel de agarosa 2 %. MPM: marcador de peso molecular; C+: control positivo sobre ADN de

la construcción *ProMtLBD1*; C-: control negativo de la PCR con agua. El ensayo de ChIP-PCR fue realizado sobre muestras de plantas salvajes (A17) y sobre raíces transformadas con la construcción *ProMtHBI:MtHBI:2xHA*. El lisado inicial corresponde a los extractos de núcleos sonicados antes del reconocimiento de los anticuerpos α -HA. Las dos calles HA corresponden al duplicado del experimento.

Los perfiles de expresión opuestos de *MtLBD1* y *MtHBI* se correlacionan con el efecto del estrés medioambiental sobre la acción de las auxinas durante la emergencia de las raíces laterales

Para analizar de qué manera el medio circundante de la raíz controla a través de *MtHBI* la vía de señalización dependiente de *MtLBD1* en la formación de raíces laterales, decidimos correlacionar el efecto fisiológico de las auxinas, el ABA y la sal, con el comportamiento molecular de ambos genes en plantas salvajes de *M. truncatula*. Para ello analizamos la arquitectura radicular de plántulas de 3 días expuestas durante 6 días adicionales a diferentes tratamientos (Figura 1.24).

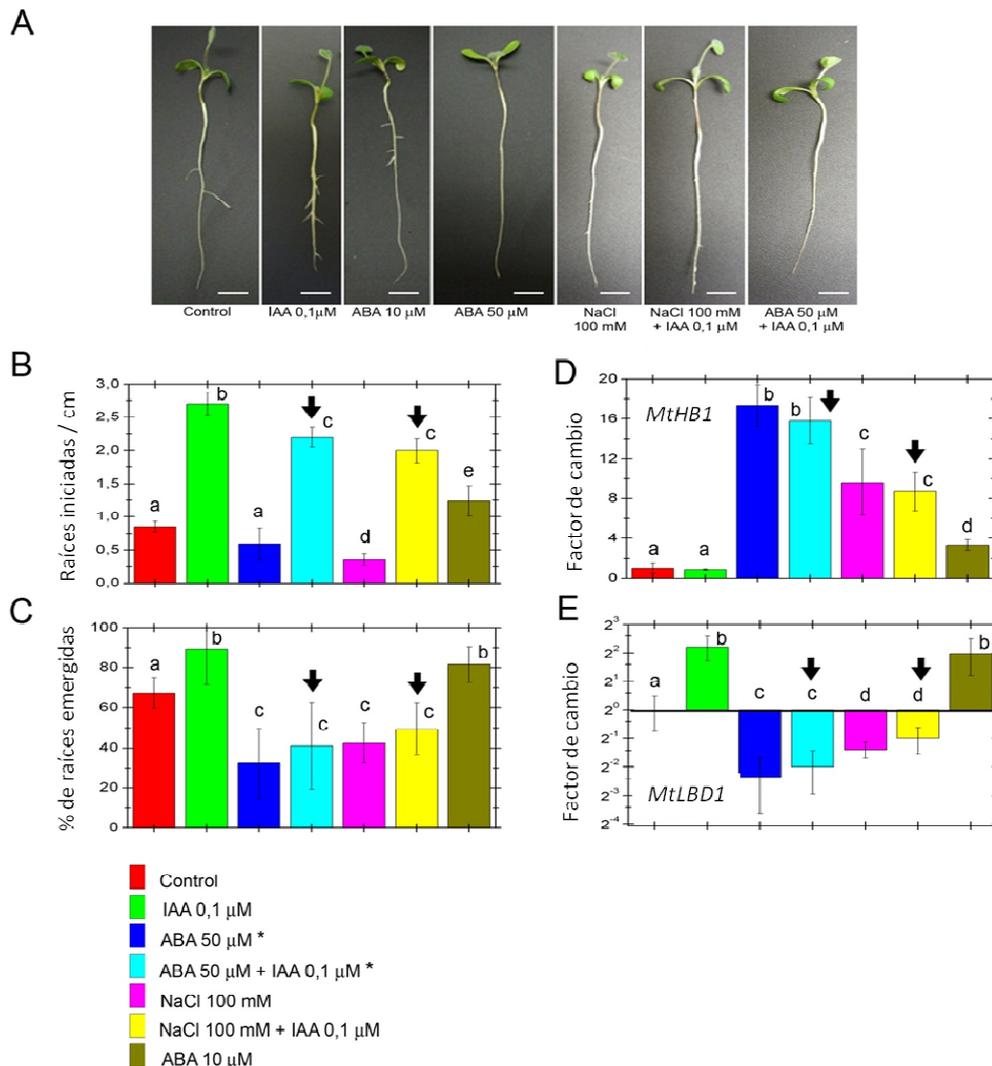


Figura 1.24. Las plantas salvajes presentan respuestas morfológicas y moleculares a los tratamientos con auxinas, ABA y NaCl. A) Ejemplares representativos de los tratamientos a largo plazo (6 días) en placas suplementadas con ABA, IAA, NaCl o sus combinaciones. Las líneas de escala representan 1 cm. B-C) Raíces laterales iniciadas totales por cm de la raíz principal (B) y porcentaje de raíces laterales emergidas (C) en plantas salvajes de *M. truncatula* (A17) luego de 6 días del tratamiento indicado en las referencias de colores debajo de los gráficos (n > 20 por condición, Kruskal-Wallis, P < 0,05). Las letras indican que los valores promedios de los grupos difieren significativamente. Las barras de error representan la desviación estándar. D-E) Cuantificación de las concentraciones relativas de transcripto de los genes *MtHB1* (D) y *MtLBD1* (E) luego de tratamientos de 3 h con IAA, ABA y/o NaCl, según se indica. Las barras están expresadas en escala lineal (D) y en log₂ (E), respectivamente, y los valores

fueron normalizados con el gen *H3L*. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 replicados biológicos. Los asteriscos indican que en los casos de tratamientos cortos para análisis molecular, la concentración fue de 100 μM en lugar de 50 μM .

El ácido indolacético (IAA, auxina) 0,1 μM indujo la iniciación de raíces laterales, pero no así su emergencia (barras verdes, Figura 1.24B y C). En concordancia con lo que fue demostrado anteriormente (Liang y col., 2007), el ABA 10 μM indujo la iniciación y emergencia de las raíces laterales en forma leve pero significativa (barras marrones). Por otro lado, el ABA en una concentración de 50 μM ejerció un efecto negativo drástico tanto a nivel de la iniciación como de la emergencia de las raíces laterales, comparable al efecto del NaCl 100 mM (barras azules y rosas, respectivamente). Fue notorio que el efecto represivo sobre la emergencia ejercido por el ABA 50 μM o el NaCl 100 mM no se revirtiera por la acción del IAA 0,1 μM , aún cuando la iniciación de raíces laterales siguiera fuertemente inducida (barras celestes y amarillas), indicando que el efecto del estrés por sobre la acción de las auxinas, tiene lugar durante la emergencia y no en la iniciación de las raíces laterales.

Luego analizamos la respuesta molecular de *MtHBI* y *MtLBD1* a tratamientos de 3 h con las mismas combinaciones de sal y hormonas (Figura 1.24C y D). El IAA indujo la transcripción de *MtLBD1* (barras verdes), conforme a lo publicado acerca de otros genes *LBDs* en *Arabidopsis* (Okushima y col., 2005). Las bajas concentraciones de ABA (10 μM), que tuvieron un efecto positivo en la formación de raíces laterales, indujeron la transcripción de *MtLBD1* y también levemente la de *MtHBI* (barras marrones). Por el contrario, las altas concentraciones de ABA o NaCl regularon a *MtHBI* y *MtLBD1* en forma opuesta, induciendo a uno y reprimiendo al otro, respectivamente (barras azules y rosadas). Esta respuesta molecular es acorde al efecto represivo a largo plazo en la formación de raíces laterales. Sin embargo, lo más destacable de este análisis consistió en que la inducción de *MtLBD1* por IAA fue absolutamente revertida a una represión al ser combinado con ABA o NaCl (barras celestes y amarillas, indicadas con flechas). Este fenómeno molecular explicaría por qué la combinación de la aplicación conjunta de IAA con ABA o NaCl reprimió la emergencia de las raíces laterales a largo plazo, aún cuando la iniciación estaba inducida.

Con el propósito de relacionar la correlación entre la arquitectura radicular y el comportamiento molecular de ambos genes, con la regulación directa de MtHB1 a *MtLBD1*, decidimos analizar por fluorimetría la actividad de *ProMtLBD1* y de *Pro-MUT-MtLBD1* en respuesta a IAA e IAA con ABA utilizando las fusiones al gen reportero *GUS* (Figura 1.25). Como era de esperarse, *ProMtLBD1* fue activado por IAA pero no por IAA más ABA. Además de que el nivel basal de actividad de *Pro-MUT-MtLBD1* fue desregulado, la inducción por IAA no se revirtió por el agregado de ABA. Esto demostró que la represión de la actividad del promotor de *MtLBD1* está directamente asociada al elemento *cis* reconocido *in vivo* por MtHB1.

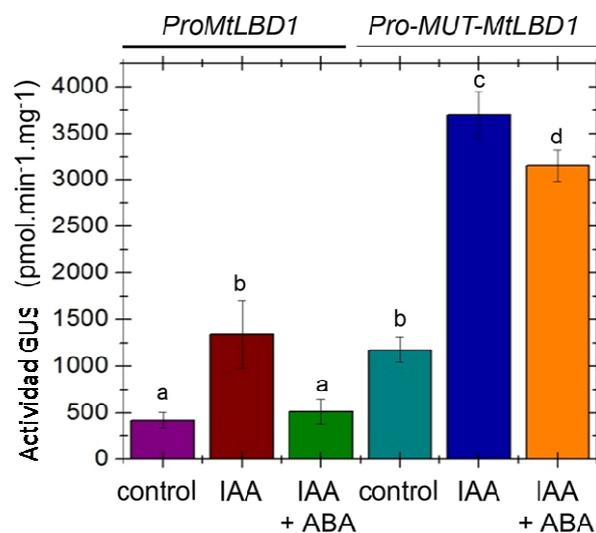


Figura 1.25. El elemento *cis* reconocido por MtHB1 en el promotor de *MtLBD1* es fundamental para que se ejerza la represión de la expresión de este gen por ABA. Las barras expresan la actividad GUS absoluta (calculada con una curva patrón) dirigida por las construcciones *ProMtLBD1:GUS* y *Pro-MUT-MtLBD1:GUS* en condiciones normales y luego de la inducción por 3 h con IAA 0,1 μ M solo o conjuntamente con ABA 100 μ M. En todos los casos $n > 20$; Kruskal-Wallis $p < 0,05$. Las barras de error representan la desviación estándar entre los replicados biológicos.

Por último, nos propusimos corroborar que, además de estar expresado durante la formación de raíces laterales y de ser inducido por auxinas, *MtLBD1* juega un papel primordial en la arquitectura radicular. Expresamos constitutivamente el ADNc de *MtLBD1* en raíces de *M. truncatula*. Sin alcanzar un análisis exhaustivo del fenotipo resultante, podemos aseverar que ante un tratamiento de dos semanas con NaCl 50 mM,

concentración que normalmente afecta la emergencia de las raíces laterales, las raíces *35S:MtLBD1* presentan una raíz principal significativamente más corta y una densidad de masa por cm superior (Figura 1.26), coherentemente con los fenotipos observados tanto de las raíces que sobre expresan *MtHB1* como de las plantas mutantes *mthb1-1*.

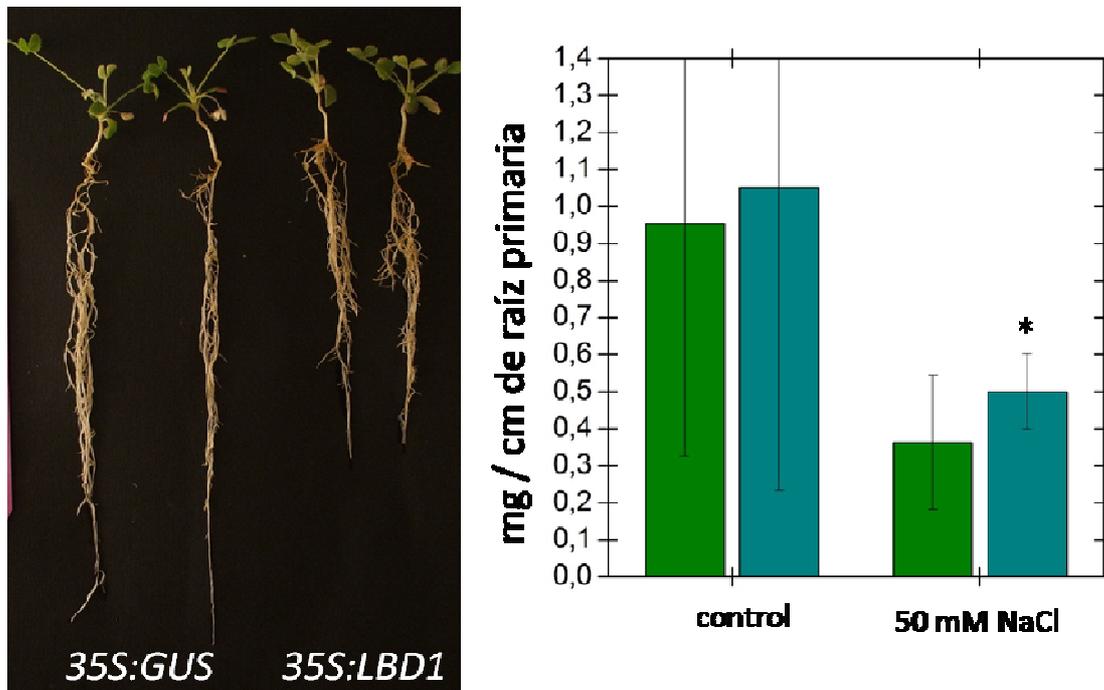


Figura 1.26. *MtLBD1* está implicado directamente en la determinación de la arquitectura radicular de *M. truncatula*. A) Ejemplares de plantas cuyas raíces fueron transformadas con una construcción control (*35S:GUS*) y con *35S:MtLBD1*, crecidas en una mezcla de arena y perlita, en invernadero durante 2 semanas y regadas con medio líquido suplementado con NaCl 50 mM. B) Las barras expresan el valor de peso seco promedio por cm de la raíz principal de las plantas control y de las sobre expresantes de *MtLBD1*. En todos los casos $n > 20$. El asterisco indica una diferencia significativa entre ambos grupos (test t de Student $p < 0,01$). Las barras de error representan la desviación estándar entre los replicados biológicos.

Discusión

La interacción M_tHB1-M_tLBD1 afecta la arquitectura radicular: la pulseada molecular entre el ambiente y las señales internas

Dada su naturaleza sésil, las plantas necesitan imperiosamente adaptar su desarrollo post-embrionario a las condiciones medioambientales. La capacidad que un organismo vegetal tenga para interpretar las señales del medio y en función de estas señales adaptar su desarrollo, es lo que le permitirá maximizar el uso de los recursos circundantes y finalmente subsistir como especie. Esta característica tiene un impacto primordial en la producción agropecuaria.

En este capítulo asignamos un rol al FT M_tHB1 de *M. truncatula* en la regulación de la emergencia de las raíces laterales. También dilucidamos el mecanismo molecular mediante el cual este FT regulado por el medioambiente reprime en forma directa a un FT del tipo LOB, regulado por auxinas. Este mecanismo ocurre en las regiones meristemáticas y podría definir un nuevo punto de cruce entre las vías de señalización de las auxinas y el ABA.

El interés creciente en la descripción de los genomas de las plantas leguminosas, tanto de los modelos de estudio como de las especies cultivables (Choi y col., 2004; Cannon y col., 2009) refleja su importancia económica en todo el mundo. Aunque se han identificado varios FTs de leguminosas por su potencial relación con el estrés abiótico, la disponibilidad de nutrientes y la simbiosis fijadora de nitrógeno, el conocimiento sobre sus mecanismos de acción continúa siendo incierto (Udvardi y col., 2007). Hasta ahora, el único FT de la familia HD-Zip I de leguminosas identificado por análisis genético está involucrado en la formación de los zarcillos foliáceos en la arveja (el gen *TENDRIL-LESS*; Figura 1.6; Hofer y col., 2009). Ningún fenotipo de raíz fue informado para la mutante *tendrill-less*. Este trabajo de investigación es el segundo, entonces, en analizar una planta mutante de un FT de la familia HD-Zip I en leguminosas, y el primero que a su vez esté relacionado a la respuesta de las raíces al estrés.

Las plantas *mthb1* tienen globalmente afectada su arquitectura radicular. La anatomía tanto de las raíces laterales como de los nódulos simbióticos es normal, pero la

densidad de raíces laterales emergidas es significativamente más alta. La aparición de un número mayor de raíces laterales fue descripta también para las mutantes de *M. truncatula cre1* (insensible a las fitohormonas citoquininas; González-Risso y col., 2006) y *skl* (insensible al etileno; Penmetsa y col., 2008). Sin embargo, en estas mutantes también estaba afectado el número de nódulos. Por su parte, la mutante *har1* de la planta leguminosa *Lotus japonicus* es hiper-noduladora y a su vez presenta un incremento en la formación de raíces laterales (Wopereis y col., 2000). Por otro lado, la mutante *latd* de *M. truncatula* sufre deficiencias en el desarrollo de nódulos y raíces laterales (Bright y col., 2005; Liang y Harris, 2005; Liang y col., 2007). *LATD* fue recientemente clonado e identificado como miembro de la familia de transportadores *NRT1* y su expresión está regulada tanto por auxinas como por ABA (Yendrek y col., 2010). La mutante *mthb1* revela una vía de regulación alternativa de la arquitectura radicular de las leguminosas, con nodulación normal y un incremento significativo en la emergencia de las raíces laterales. La raíz principal de las plantas *latd* mostró un defecto en la organización del ápice, con una acumulación menor de amiloplastos en la caliptra en condiciones normales. Este fenotipo fue revertido al agregar ABA 10 μM (Liang y col., 2007). En las plantas mutantes *mthb1* detectamos una desorganización del ápice con una acumulación menor de amiloplastos sólo en condiciones de estrés salino, en las que se genera ABA. Este defecto podría acentuar el fenotipo de emergencia de las raíces laterales observado en condiciones de estrés, ya que el bloqueo del crecimiento de la raíz principal induce la formación de las raíces laterales (Osmont y col., 2007). Cabe destacar, de todos modos, que MtHB1 juega un rol en la emergencia de las raíces laterales aún en condiciones normales.

El fenotipo de las plantas *mthb1* puede deberse a la desregulación de *MtLBD1*. En *Arabidopsis*, los genes de la familia *LBD* participan en diferentes etapas de la formación de las raíces laterales, hasta antes de la emergencia. *AtLBD16* y *18* están además regulados en forma directa por ARF7 y 19, dos FTs típicamente de respuesta a auxinas (Okushima y col., 2005; Péret y col., 2009b; Lee y col., 2009). Aunque no hemos encontrado Elementos de Respuesta a Auxinas (AuxREs) como los descritos en *Arabidopsis* en la región promotora de *MtLBD1*, su expresión está regulada por auxinas exógenas. Esto podría estar indicando que los elementos en *cis* que responden a estas hormonas no están conservados literalmente entre *Arabidopsis* y *Medicago*. Los genes homólogos de la familia *LBD* parecen cumplir roles diferentes en cada especie, ya que

los genes más cercanos en arroz y maíz a *AtLBD16* y *18* participan en la formación de la base de la raíz (Hochholdinger y Zimmermann, 2008). Resulta interesante pensar que a pesar de la dificultad de asignar un homólogo de *MtLBD1* en *Arabidopsis* (Figura 1.18), uno de los genes de clase II más cercanos en el árbol filogenético, *AtLBD37*, fue recientemente descrito como actor en el metabolismo del nitrógeno (Rubin y col., 2009) y además contiene una caja CAATAATTG en su región promotora proximal. Considerando que además *AtHB7* y *12* son inducidos por ABA y estrés abiótico en *Arabidopsis* (Söderman y col., 1994; Olsson y col., 2004), se podría postular que la represión de una vía dependiente de auxinas en respuesta a un estrés ambiental con el fin de regular la formación de raíces laterales sea un mecanismo conservado entre especies. El hecho de que en *Arabidopsis* *AtHB7* y *12* aparezcan como genes duplicados, a diferencia *MtHB1* en *M. truncatula*, explicaría por qué el silenciamiento de *AtHB7* no fue suficiente para obtener un fenotipo observable (Hjellström y col., 2003). Es decir, *AtHB7* y *12* tendrían probablemente funciones redundantes en *Arabidopsis* mientras que *MtHB1* sería único en *Medicago*. El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR (ChIP-PCR) es considerado de elección para corroborar la interacción directa de un FT con su secuencia blanco de ADN *in vivo*, y ya ha sido utilizado para dilucidar redes regulatorias de la transcripción durante la organogénesis de nódulos en leguminosas (Hirsch y col., 2009). Este ensayo nos permitió demostrar por primera vez la existencia de una interacción física directa entre una proteína de tipo HD-Zip I y su gen blanco.

El rol de las auxinas en la formación de las raíces laterales ha sido descrito con minuciosidad (Fukaki y col., 2009; Péret y col., 2009a y b). El papel crucial de estas hormonas en la emergencia de las raíces laterales fue puesto de manifiesto recientemente con la caracterización del transportador de flujo de auxinas LAX3 en *Arabidopsis* (Swarup y col., 2008). La modulación y la señalización de las auxinas en las células adyacentes al primordio inducen la activación específica de enzimas que debilitan la pared celular, facilitando la emergencia de la raíz. Por otro lado, se ha descrito cómo una condición del medio, como lo es la escasez de fosfato inorgánico, es capaz de regular la formación de las raíces laterales alterando la sensibilidad y respuesta a las auxinas. Esto se logra modificando la expresión de TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1), un receptor de auxinas (Pérez-Torres y col., 2008). Además, en *Arabidopsis* las vías de señalización del ABA y las de auxinas comparten

ciertos actores comunes, incluyendo FTs tales como ABI3 (Brady y col., 2003). La expresión de *ABI3*, un gen identificado por su rol en la respuesta a ABA, se regula positivamente por las auxinas en el primordio de las raíces laterales, y a su vez las plantas mutantes *abi3* muestran una menor formación de raíces laterales en respuesta a auxinas exógenas. La relación directa entre Mthb1 y *MtLBD1* combina un FT de respuesta a ABA que reprime un FT regulado por auxinas, como ABI3. Por su parte, el ABA juega un rol central en mediar el efecto del nitrato en la ramificación de las raíces de *Arabidopsis* (Signora y col., 2001). Nuestros resultados muestran cómo el estrés abiótico sufrido por *M. truncatula* recluta un FT de respuesta a ABA para reprimir una vía dependiente de *MtLBD1* y determinar una nueva arquitectura radicular adaptada al medio. Proponemos entonces que Mthb1 formaría parte de una compleja interacción entre las vías de señalización del ABA y de las auxinas en las raíces. Ante condiciones adversas, los mecanismos moleculares preexistentes se reorganizan para responder de forma plástica y eficiente con una nueva forma global de la raíz. La inducción de *MtHB1* por condiciones de estrés logra reprimir la emergencia de nuevas raíces laterales, disminuyendo la superficie de contacto del órgano con el medio estresante (Figura 1.27).

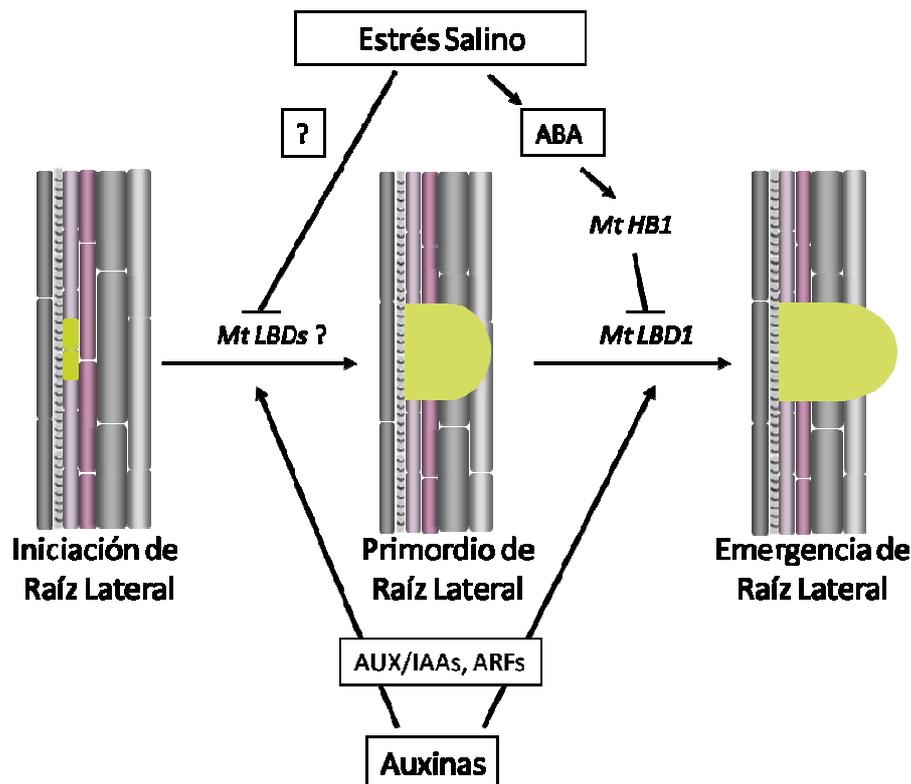
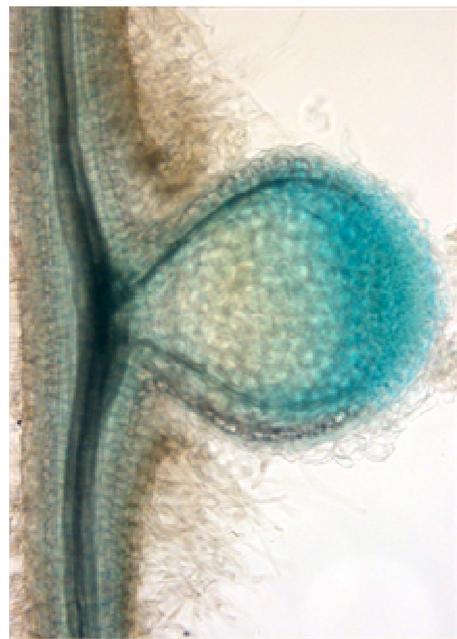


Figura 1.27. Rol propuesto para MtHB1 respecto a la emergencia de las raíces laterales. Se esquematizan las tres etapas de la formación de las raíces laterales (iniciación, formación del primordio y emergencia). MtHB1 reprime directamente a *MtLBD1* en el primordio. Cuando las raíces son expuestas al estrés o altas concentraciones de ABA, MtHB1 controla la emergencia de las raíces laterales, reprimiendo a *MtLBD1*. MtHB1 participa en la respuesta que da lugar a la plasticidad del desarrollo necesaria para adaptar la arquitectura radicular al medio circundante.

En conclusión, MtHB1 participa en la plasticidad del desarrollo de las raíces, regulando directamente a *MtLBD1*. La identificación en el futuro de los genes blanco de *MtLBD1* será de vital importancia para la comprensión de la red regulatoria mediante la cual el ABA y las auxinas determinan la emergencia de las raíces laterales en *Medicago truncatula* y más generalmente en las leguminosas.

Capítulo 2



“... la mediocridad para algunos es normal, la locura es poder ver más allá...”
(Charly García)

Los factores de transcripción RRs de Tipo B regulan la expresión de genes involucrados en la nodulación en respuesta a las citoquininas

Las fitohormonas citoquininas y la nodulación

Como fue descrito en la introducción general, las citoquininas cumplen un papel fundamental en el control de la proliferación, elongación, diferenciación y senescencia de distintos tipos celulares en varios órganos de la planta (Werner y Schmülling, 2009). Ante la falta de nutrientes, las leguminosas tienen la capacidad de interactuar con hongos (micorrizas) o bacterias fijadoras de nitrógeno generando un nuevo órgano, el nódulo. Este nuevo órgano, el nódulo fijador de nitrógeno, se forma en las raíces de la planta huésped en respuesta a bacterias simbióticas específicas. Para *Medicago truncatula* el micro simbiote es *Sinorhizobium meliloti*. Los estudios fisiológicos, y más recientemente también los de orden genético, han demostrado que la organogénesis de los nódulos requiere de la acción de las citoquininas (Frugier y col., 2008). A modo de ejemplo, los experimentos de silenciamiento sistemático utilizando ARN de interferencia para diferentes receptores de citoquininas de *M. truncatula* demostraron que la HISTIDINA KINASA MtCRE1 (del inglés, *M. truncatula* CYTOKININ RECEPTOR ELEMENT 1) controla la formación de los nódulos (González-Rizzo y col., 2006). En el mismo sentido, la mutante *hit1* (del inglés, *hyperinfected 1*) de la planta modelo de leguminosas *Lotus japonicus* presenta un número de nódulos muy inferior al de la planta salvaje. En esta mutante el gen *LHK1*, que codifica para una HISTIDINA KINASA relacionada funcionalmente a MtCRE1, no es funcional (Murray y col., 2007). Otra evidencia que apoya que la organogénesis de los nódulos requiere de la acción de las citoquininas es la observación de la mutante *snf2* (del inglés, *spontaneous nodule formed 2*) de *L. japonicus*, que sufre una ganancia de función del mismo gen *LHK1*. Esta mutante puede formar nódulos espontáneamente en ausencia de rizobios (Tirichine y col., 2007). Este conjunto de resultados indicó que las citoquininas son necesarias y suficientes para activar la división de las células corticales y la organogénesis de los nódulos.

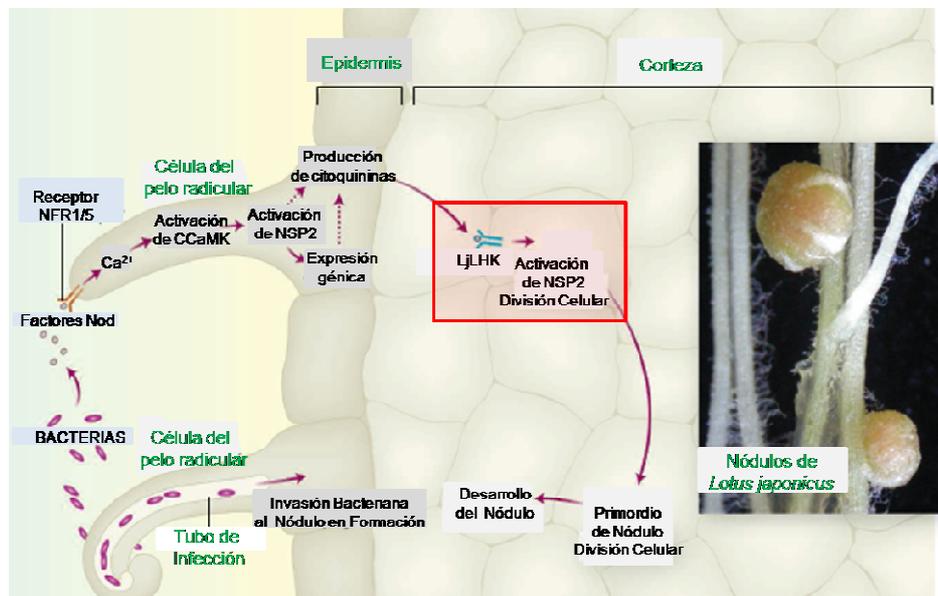


Figura 2.1. Esquema de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la formación de los nódulos simbióticos en la planta modelo de leguminosas *Lotus japonicus*. LjLHK es el receptor de citoquininas ortólogo del de *M. truncatula*, CRE1. El recuadro rojo destaca que NSP2 es activado por las citoquininas en las células de la corteza. Adaptado de Oldroyd y col. (2008).

La interacción simbiótica de la planta con rhizobium depende del reconocimiento específico de ambos actores, involucrando los flavonoides presentes en los exudados de la raíz, así como los lipo-quito-oligosacáridos de las bacterias que actúan como señales moleculares, también conocidos como factores Nod (Oldroyd y Downie, 2008). Se caracterizaron varias plantas mutantes incapaces de nodular, permitiendo identificar distintos FTs relacionados con este proceso (Crespi y Frugier, 2008). Los genes *NSP1* y *NSP2* (del inglés, *NODULATION SIGNALING PATHWAY*) codifican dos FTs con dominio GRAS de unión a ADN, y actúan en las etapas tempranas de la organogénesis de los nódulos (Smit y col., 2005; Kaló y col., 2005; Heckmann y col., 2006; Murakami y col., 2006). Recientemente se ha demostrado que MtNSP1 y MtNSP2 forman un complejo transcripcional asociado directamente al promotor del marcador de la nodulación temprana *ENOD11* (del inglés, *EARLY NODULATION 11*; Hirsch y col., 2009). Por otro lado, el

estudio de interacciones genéticas permitió determinar que en *L. japonicus*, LHK1 actúa corriente abajo de la percepción de los factores Nod, y corriente arriba de LjNSP2, proteína que a su vez activa las divisiones corticales que dan lugar a la organogénesis de los nódulos (Tirichine y col., 2007). Sin embargo, la relación entre las vías de señalización de las citoquininas y de los factores Nod continúa siendo incierta.

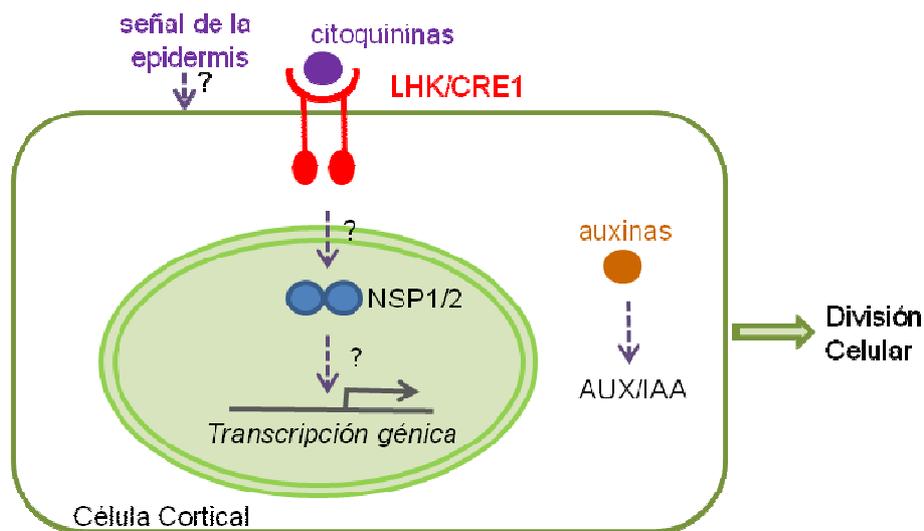


Figura 2.2. Esquema de la activación de NSP1 y 2 por las citoquininas y su acción a nivel molecular y celular. Hasta el momento se desconocía qué actores median la recepción de la señal de las citoquininas (por LjLHK/MtCRE1) y la expresión de de NSP1 y NSP2, FTs clave en las etapas tempranas de la nodulación. El balance de las respuestas a las citoquininas y las auxinas desencadena la correcta división celular y formación del primordio. Adaptado de Oldroyd (2008).

La Familia RR de Tipo B de Factores de Transcripción

En Arabidopsis, la señal de las citoquininas es percibida a través del dominio extracelular CHASE (del inglés, CYCLASE/HISTIDINE KINASE-ASSOCIATED SENSING EXTRACELLULAR) presente en los receptores transmembrana CRE1/AHK4 y de otros dos sensores HISTIDINA KINASAS, AHK2 y AHK3 (Werner y Schmülling, 2009). Corriente abajo de la cascada de señalización se inicia el proceso de fosforilación

dependiente de histidina y ácido aspártico, durante el cual las proteínas de fosfotransferencia de histidina aparentemente llevan la señal al núcleo, y activan a los FTs preexistentes de la familia RR (del inglés, RESPONSE REGULATORS) de Tipo B. Estos FTs pertenecen a la Súper Familia de proteínas MYB, presentes en organismos de todos los reinos eucariotas (Stracke y col., 2001). Los RRs de Tipo B pueden transactivar a los RRs de Tipo A, genes de respuesta primaria a citoquininas (Hwang y Sheen, 2001; Sakai y col., 2000 y 2001). Esta activación es rápida y tiene lugar en presencia del inhibidor de síntesis proteica cicloheximida (CHX), lo que implica que este evento es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas y que recae en los elementos preexistentes de las vías de fosforilación (Brandstatter y Kieber, 1998; d'Agostino y col., 2000; Sakai y col., 2001). Se ha postulado que los RRs de Tipo A actuarían como reguladores negativos de la acción de los RRs de Tipo B, cerrando un circuito de regulación.

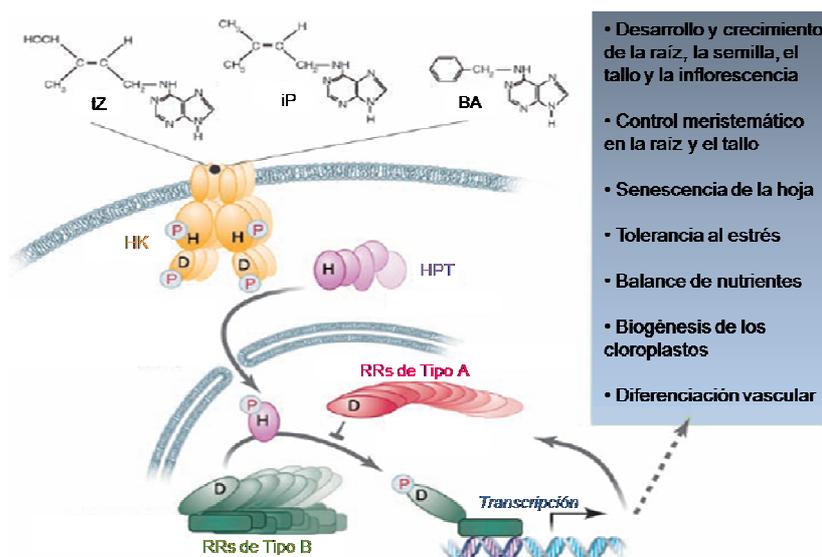


Figura 2.3. Esquema de la activación de los FTs RRs de Tipo B por parte del sistema de FOSFO-TRANSFERASAS en respuesta a las citoquininas. El receptor MtCRE1 captura la señal de las citoquininas, y su dominio histidina-kinasa envía un complejo de transferencia del grupo fosfato que activará post-traduccionalmente a los RRs de Tipo B. Su acción como FTs activará la transcripción de sus genes blanco, incluyendo a los RRs de Tipo A que regularán negativamente su actividad.

Los estudios de interacción proteína-ADN de RRs de tipo B de Arabidopsis (ARR1, ARR2, ARR10 y ARR11) permitieron determinar una secuencia blanco consenso 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' (Sakai y col., 2000; Lohrmann y col., 2001; Hosoda y col., 2002; Imamura y col., 2003; Heyl y Schmülling, 2003). Estos motivos de ADN son muy pequeños y por lo tanto se encuentran en una frecuencia muy alta en las regiones promotoras de los genes, lo que hace prácticamente imposible la identificación de genes regulados en forma directa por los RRs de Tipo B. Es muy probable que la secuencia reconocida y unida por estos FTs sea más extendida para permitir una interacción específica de cada RR en el contexto de un promotor determinado, especialmente para discriminar entre los diferentes FTs de la súper familia MYB, de tipo GARP (GOLDEN2/ARRs/PSR1/PHR1; Taniguchi y col., 2007).

Los Genes de Respuesta Primaria a las Citoquininas

Los variados análisis transcriptómicos llevados a cabo en Arabidopsis indicaron que existía una multiplicidad de genes de respuesta rápida al tratamiento con citoquininas exógenas, tanto en plántulas salvajes, como en transgénicas y mutantes afectadas en sus niveles de citoquininas endógenas o en su sensibilidad a estas hormonas (Rashotte y col., 2003; Hoth y col., 2003; Kiba y col., 2004; Brenner y col., 2005; Kiba y col., 2005; Rashotte y col., 2006; Taniguchi y col., 2007). Recientemente se identificaron diecisiete posibles genes blanco haciendo uso de una versión de la proteína ARR1 que carecía del dominio receptor de fosfato (Δ DDK). La transactivación de estos genes sería independiente de la síntesis proteica *de novo* (Taniguchi y col., 2007). Además de los RRs de Tipo A, existirían otros genes probablemente regulados por ARR1. La función de dos de ellos estaría relacionada al metabolismo de las citoquininas: una HIDROLASA y una OXIDASA/DESHIDROGENASA de citoquininas; y un tercero participaría en la señalización de las auxinas: *IAA3*/*SHY2*. Cabe mencionar que existe una controversia sobre la regulación por citoquininas de dos FTs de la familia AP2/ERF (del inglés, APETALA 2/ETHILENE RESPONSE FACTOR), previamente identificados como CRFs (del inglés,

CYTOKININ RESPONSE FACTORS; Rashotte y col., 2006) y de una CICLINA D3 (CYCD3). Estos genes no mostraron regulación positiva por citoquininas en presencia de CHX (Rashotte y col., 2003), a pesar de que en estudios previos se había o concluido lo contrario (Riou-Khamlichi y col., 1999). Esta inconsistencia se debe, probablemente, a los distintos procedimientos experimentales aplicados y sugiere que el criterio de la dependencia de CHX para definir la respuesta primaria de los genes a un determinado estímulo no es siempre confiable. El análisis de los promotores de todos estos nuevos genes inducidos por citoquininas permitió extender la secuencia de ADN consenso, probablemente reconocida por los RRs de Tipo B, al palíndromo: 5'-AAGAT(C/T)TT-3' (Taniguchi y col., 2007).

Resultados

El análisis transcripcional de la respuesta a corto plazo a las citoquininas de los ápices de las raíces de *Medicago truncatula*: Nuevas vías funcionales de respuesta a estas fitohormonas

Con el fin de comprender mejor el rol de las citoquininas en las raíces de las leguminosas, desarrollamos un estudio transcripcional que nos permitiera identificar los genes regulados por un tratamiento de 1 h con Bencil Amino Purina (BAP) 10^{-7} M, un compuesto sintético ampliamente utilizado como citoquinina exógena, basados en el sistema de microarreglos de 16k+ (Henckel y col., 2009). Las muestras de ARN que se utilizaron provinieron del ápice de las raíces (aproximadamente 1 cm) de plantas de 10 días de edad, crecidas en una mezcla de arena y perlita. Las raíces sobresalían del fondo de red de las macetas y el tratamiento se realizó reemplazando el medio de cultivo líquido por medio fresco suplementado o no con BAP 10^{-7} M durante 1 h. Aplicamos un criterio estadístico astringente (Tabla 2.1; |Factor de Cambio| > 1,5; Valor Ajustado $p < 0,001$; Promedio A > 7; ver Materiales y Métodos) que nos permitió identificar 297 transcritos

regulados por citoquininas, de los cuales 190 fueron inducidos y 107, reprimidos (Anexo 1, Tabla 2.1).

BAP 10^{-7} M 1h	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001
Factor de Cambio > 1,8	537	407	225
Factor de Cambio > 1,5	942	635	297

Tabla 2.1. Números exactos de genes expresados diferentemente en respuesta a citoquininas en los ápices de las raíces de *M. truncatula* según los criterios de astringencia.

Se identificaron las categorías funcionales más afectadas (definidas por Mapman “BINs”; Telström y col., 2007) usando un test t de Fisher exacto (Figura 2.4). Los genes implicados en los metabolismos de los flavonoides y de las giberelinas resultaron estar modulados significativamente ($p < 0,001$) por las citoquininas. También se afectaron genes correspondientes a dos familias enzimáticas ($p < 0,002$): las UDP GLUCOSIL y GLUCORONIDIL TRANSFERASAS (UDP-GT), así como las familias del CITOCROMO P450 (Figura 2.4B). Cabe destacar que algunas UDP-GT participan en el metabolismo de los flavonoides, mientras que otras han sido anotadas como enzimas conjugadas de las citoquininas (por ejemplo, las proteínas propuestas como ZEATINA O-GLUCOSILTRANSFERASAS MT009525 / MtGI8 TC101954 y MT000038 / MtGI8 TC100176).

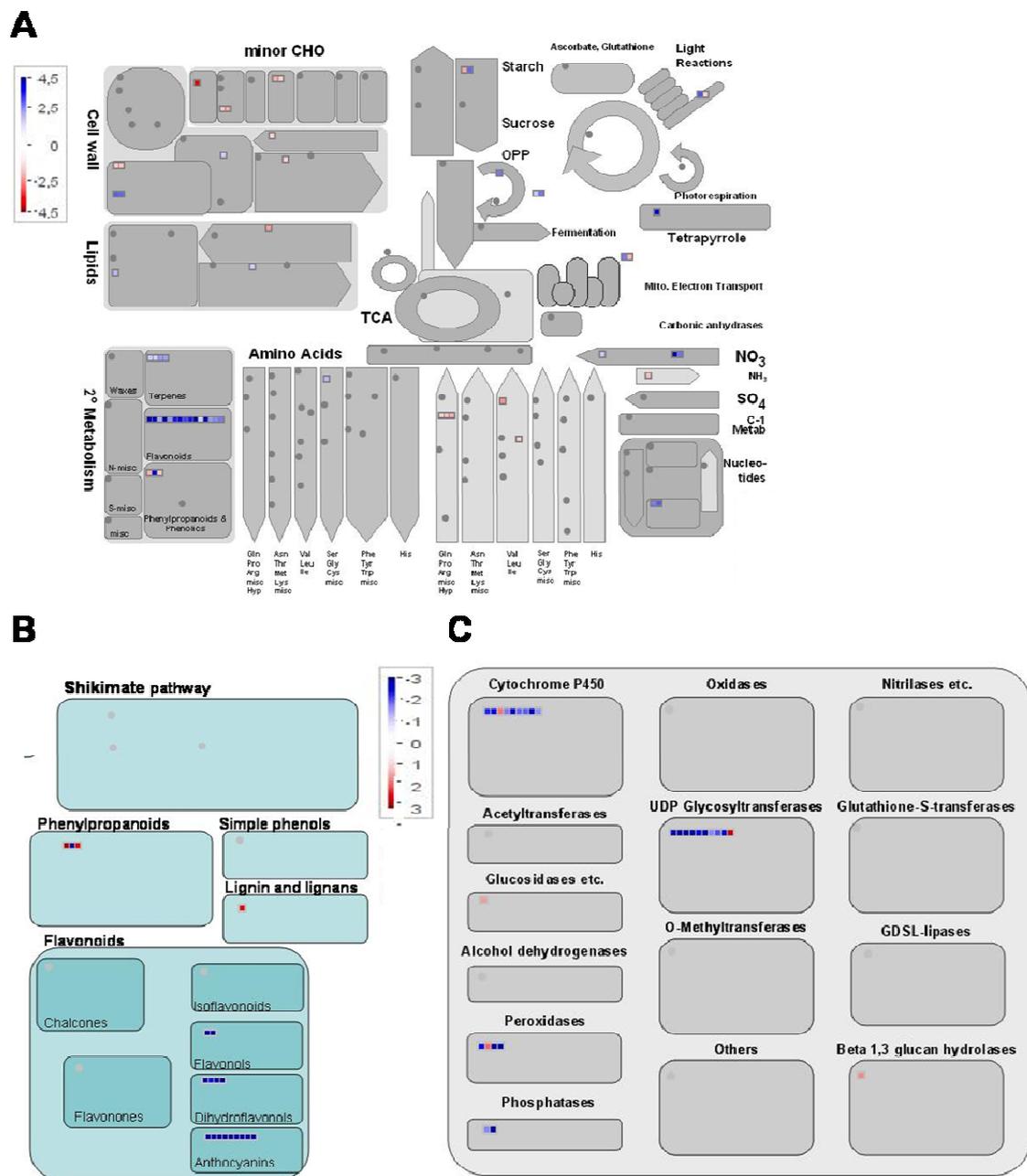


Figura 2.4. Los procesos metabólicos y las familias de enzimas regulados en respuesta al tratamiento de 1 h con citoquininas en los ápices de las raíces. Categorización de los 297 transcritos contemplados en el análisis de microarreglos de 16K+ ($|\text{Factor de Cambio}| > 1,5$; Valor p ajustado $< 0,001$; Promedio $A > 7$, ver Materiales y Métodos), realizada con el

programa Mapman (Tellström y col., 2007). Los transcriptos ausentes están indicados en gris, mientras que los transcriptos que cambian menos que un determinado valor están representados según el código de colores (basado en el cociente de \log_2), donde el azul indica inducción y el rojo represión. A) Metabolismo Primario. B) Metabolismo Secundario. C) Grandes Familias Enzimáticas.

De manera similar, varios genes que codifican enzimas de tipo CYP735-A2, pertenecientes a la súper familia de hemoproteínas conocida como CITOCROMO P450 se indujeron por el tratamiento (MT007069 / MtGI8 TC100322, MT007068 / MtGI8 TC100323 y MT007937 / MtGI8 TC94931). Se ha descrito que estas proteínas están relacionadas con el metabolismo de las citoquininas. También se encuentra regulado positivamente el gen que codifica una enzima homóloga de la activadora de las citoquininas identificada recientemente en Arabidopsis, LOG (del inglés, LONLEY GUY; Kurakawa y col., 2007) y anotada manualmente en *M. truncatula* (la única copia MtGI8 TC112199). Ningún gen que codifique para ISOPENTIL TRANSFERASAS (IPT) fue identificado, aunque esta familia está sub-representada en el transcriptoma conocido de *M. truncatula* (únicamente MtGI8 TC112199), y en consecuencia también en nuestro análisis transcripcional. En el mismo sentido, en *M. truncatula* sólo se conocen dos genes de respuesta primaria a las citoquininas que codifican RRs de Tipo A, *MtRR4* y *MtRR5*, (González-Rizzo y col., 2006). Finalmente, fue notorio un enriquecimiento significativo de genes que codifican dos familias de FTs: bHLH (del inglés, basic HELIX-LOOPE-HELIX) y AP2/ERF/EREBP (del inglés, APETALA2 / ETHYLENE RESPONSE FACTOR / ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR). Los miembros de esta última familia fueron previamente relacionados a las citoquininas mediante la identificación de los CRFs (Rashotte y col., 2006). El análisis de las secuencias de las proteínas codificadas en las bases de datos (BlastX) indicó que ninguna de las AP2/ERF reguladas por citoquininas en las raíces de *M. truncatula* presenta homología con las CRFs, incluso considerando un criterio de baja astringencia. En términos generales, nuestro análisis transcriptómico nos permitió identificar genes regulados por las citoquininas en las raíces

de las leguminosas, entre los que vale destacar a aquellos relacionados al metabolismo de las citoquininas, les giberelinas y los flavonoides, así como genes que codifican FTs de las familias bHLH y AP2/ERF.

Identificación de un elemento *cis* reconocido *in vitro* por el RR de Tipo B MtRR1 de *Medicago truncatula*

Como fue descrito más arriba, las citoquininas juegan un rol fundamental en la formación de los nódulos simbióticos de las leguminosas. Una vez que identificamos los genes inducidos en 1 h por las citoquininas en las raíces de *M. truncatula*, nuestro objetivo se focalizó en determinar qué mecanismos moleculares relacionan la actividad del receptor de citoquininas MtCRE1 con los genes que gobiernan el proceso de nodulación. Para ello, decidimos determinar la secuencia de unión de los RRs de Tipo B en *M. truncatula*, activados de manera post-traducciona l en respuesta a las citoquininas. Con este fin, elegimos el RR de Tipo B MtRR1, ya que a diferencia de otros miembros de la familia, su transcripción está enriquecida en los nódulos (González-Rizzo y col., 2006).

El dominio de unión a ADN de MtRR1 (MYB) fue expresado en forma recombinante en *E. coli* como fusión a la proteína GST de *Schistosoma japonicum*, para luego llevar a cabo su purificación mediante columnas de afinidad. Para la selección del sitio de unión asistida por PCR (Oliphant y col., 1989), técnica conocida como SELEX (del inglés, *Selection of Ligands by Exponential Enrichment*) se utilizó un oligonucleótido de secuencia central degenerada (12 N) y brazos conocidos. Luego de siete rondas de selección, y habiendo constatado que en la octava ronda no se produjo un enriquecimiento de la unión en los ensayos de retardo en geles, se procedió a clonar el último producto de PCR en un vector adecuado. Seguidamente, se obtuvo la secuencia de 38 clones individuales escogidos al azar. Todos los clones poseían la secuencia central TCT/AGA, que fue tomada como referencia para el alineamiento de las secuencias (Figura 2.5A).

A

Clon N°:

1 al 18 -----AATGAGACTAGT----

19 -----TAAGATTGTTAT-----

20 -----TAGATTGATATG-----

21 -----AATTAAGATCACA-----

22 TTTATAATAAAAGA-----

23 -----CAAAGACAAATAC-----

24 -AGGCAATGAGAC-----

25 -----ATGGAGAGTGCT-----

26 -----AATAAGACTAGT-----

27 -AATCCCAAGACT-----

28 ---TATACCAGAAATC-----

29 -----GGAGATGCCGGA-----

30 --ATACCTAAGATT-----

31 -----CGAAGATTGCCG-----

32 -----ACGAGATACCCC-----

33 ---CTCCCTAGAAATC-----

34 -----AGTAAGATCAAT-----

35 -----CACATTCTTAT-----

36 -----AAGATCCGGGGC-----

37 -----AAGACCATACAT-----

38 -----GAGACTGGCTGC-----

Consenso **AATGAGACTAGT**

A T

B



Figura 2.5. Resultado de la estrategia de SELEX de MtRR1. A) Secuencias alineadas de los 38 clones escogidos al azar luego de ser clonado el producto de PCR de la séptima ronda de SELEX. B) Consenso nucleotídico reconocido por MtRR1 *in vitro* mediante SELEX. Los números en el eje x indican las posiciones de los nucleótidos. El eje y representa la frecuencia (relativizado el tamaño de la letra y normalizado entre 0 y 1) de cada nucleótido en cada posición (creado con WebLogo; Crooks y col., 2004).

De los treinta y ocho clones, dieciocho resultaron idénticos y junto con los demás se dedujo una secuencia consenso de 12 pb: 5'-AAT(G/A)AGA(C/T)TAGT-3' (o su secuencia reversa y complementaria 5'-ACTA(G/A)TCT(C/T)ATT-3').

El gen *MtRR4* codifica un RR de Tipo A, previamente caracterizado como gen de respuesta primaria a citoquininas en *M. truncatula* (González-Rizzo y col., 2006). El análisis de la región promotora de *MtRR4*, considerando los 3 kpb corriente arriba desde el inicio de la traducción, ATG, reveló la existencia de cuatro cajas de 12 pb muy similares al consenso obtenido por SELEX, ubicadas entre 2 y 2,3 kpb corriente arriba del ATG (Figura 2.6). Seis nucleótidos son idénticos entre las cuatro cajas y el consenso del SELEX, y 2 a 3 nucleótidos adicionales están conservados en las diferentes cajas (desde ahora llamadas Cajas 1, 2, 3 y 4, como se muestra en la Figura 2.6).

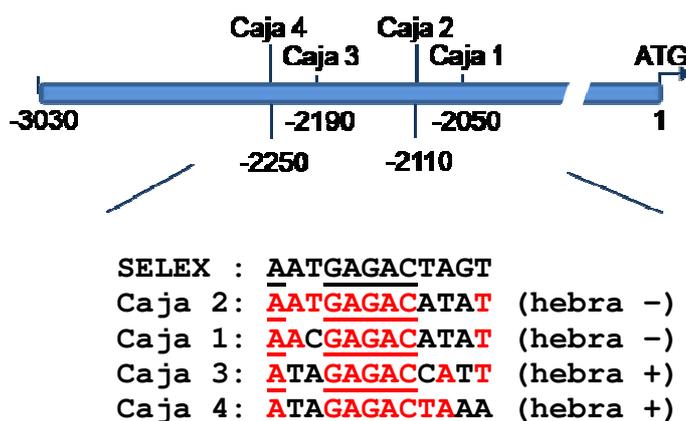


Figura 2.6. Representación esquemática de los 3 kpb del promotor del gen *MtRR4*. Las cuatro Cajas similares al consenso del SELEX están indicadas en el esquema (los números indican la posición del primer nucleótido de la Caja). El alineamiento de las Cajas en función del consenso se ubica debajo del esquema. Los nucleótidos idénticos al consenso están remarcados en rojo. Subrayados se encuentran las posiciones idénticas en todas las secuencias. La indicación “hebra +/-” se refiere al sentido en que la secuencia se ubica en el promotor.

Estas cuatro Cajas presentan entre un 66 % y un 75 % de identidad (es decir, entre 8 y 9 nucleótidos conservados con el consenso del SELEX. Los cuatro elementos están dispuestos en dos tándemes, separados por una distancia de 68 pb entre ellos, y una de 48 pb entre las Cajas 1 y 2, así como entre las 3 y 4. Además, se hicieron ensayos de retardo en geles que indicaron que la proteína recombinante MtRR1 es capaz de reconocer las cuatro secuencias *in vitro* con distinta afinidad (Figura 2.7).

GST	+						
GST-RR1		+	+	+	+	+	+
SELEX*	+	+					
Caja n°*			1	2	3	4	
SELEXmut*							+

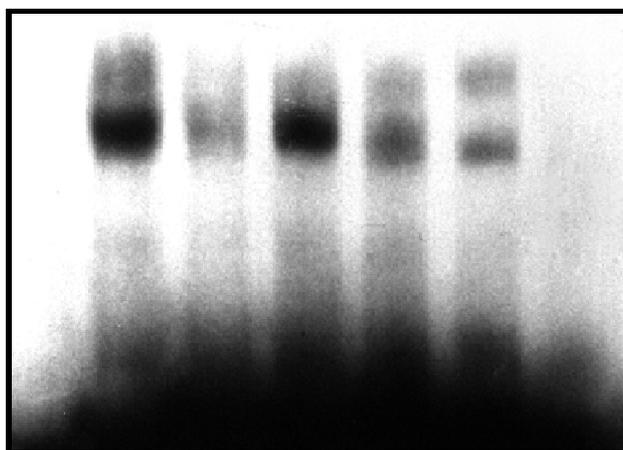


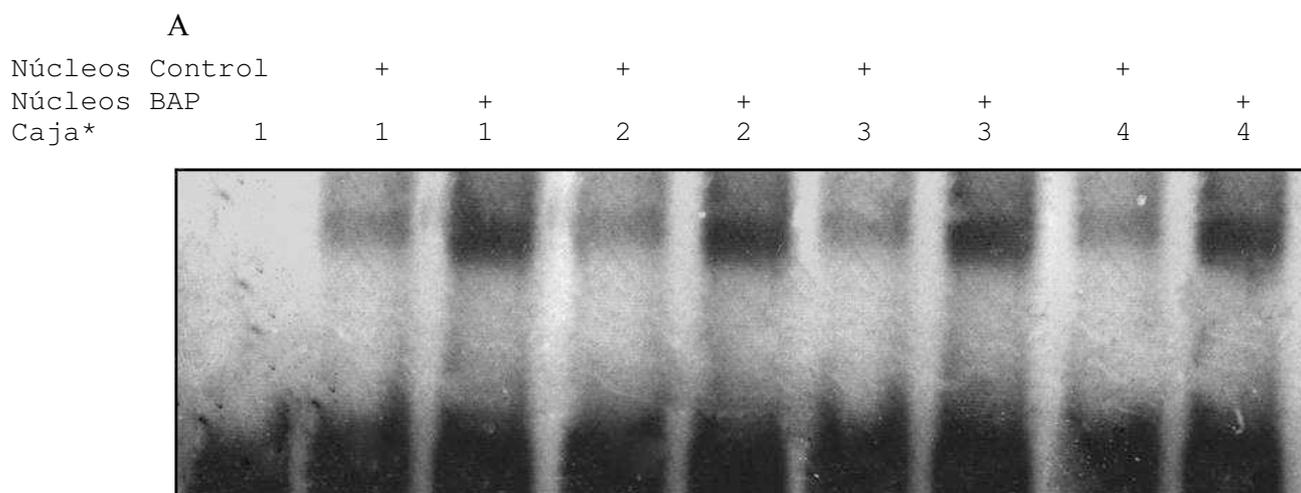
Figura 2.7. Ensayo de retardo en gel para el análisis de la unión de MtRR1 *in vitro* a los oligonucleótidos de secuencia central de 12 pb correspondientes al consenso del SELEX y las Cajas 1 a 4 del *ProMtRR4*. Las secuencias marcadas radiactivamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ están indicadas con un “*”. Como control de la especificidad de unión se utilizó un oligonucleótido en el que el núcleo central del consenso del SELEX GAGA/TCTC fue reemplazado por la secuencia ACTG/CAGT (SELEXmut).

El reemplazo del núcleo central GAGA/TCTC por CAGT/ACTG (Caja llamada SELEXmut) fue suficiente para abolir la unión de la proteína, indicando un reconocimiento muy específico de esta secuencia (Figura 2.7, última calle). Cabe mencionar que MtRR1

unió *in vitro* con mayor afinidad la secuencia deducida como consenso del SELEX (segunda calle) y la Caja 2 (cuarta calle).

Las Cajas 1 a 4 participan de la regulación del gen *MtRR4* por las citoquininas *in planta*

Para determinar el efecto de las citoquininas en el reconocimiento de los elementos *cis* potencialmente activos en el promotor de *MtRR4*, se obtuvieron extractos nucleares de raíces de *M. truncatula* tratadas o no durante 3 h con citoquininas exógenas (BAP 10^{-7} M). Con estos extractos nucleares se hicieron ensayos de retardo en geles en los que se observó que los que provenían de raíces tratadas con BAP presentaban una unión más fuerte a las 4 Cajas del *ProMtRR4* (Figura 2.8A) que aquellos que provenían de las raíces sin tratar. Además, se hicieron ensayos de competencia usando un oligonucleótido marcado radiactivamente con la secuencia de la Caja 2 y una concentración 20 veces mayor del mismo oligonucleótido sin marcar o de la secuencia SELEXmut. Los resultados de estos ensayos reforzaron las conclusiones provenientes de los anteriores, indicando que los núcleos tratados con BAP reconocen las Cajas más eficientemente y que la secuencia de la Caja 2 es unida con alta especificidad (Figura 2.8B).



B

Núcleos Control		+			
Núcelos BAP			+	+	+
Caja 2*	+	+	+	+	+
Caja 2				+	
SELEXmut					+

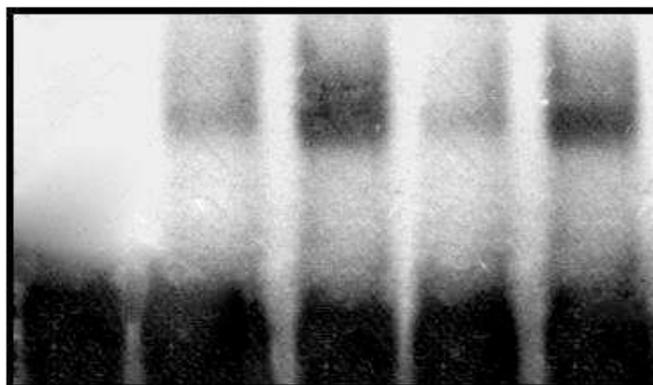
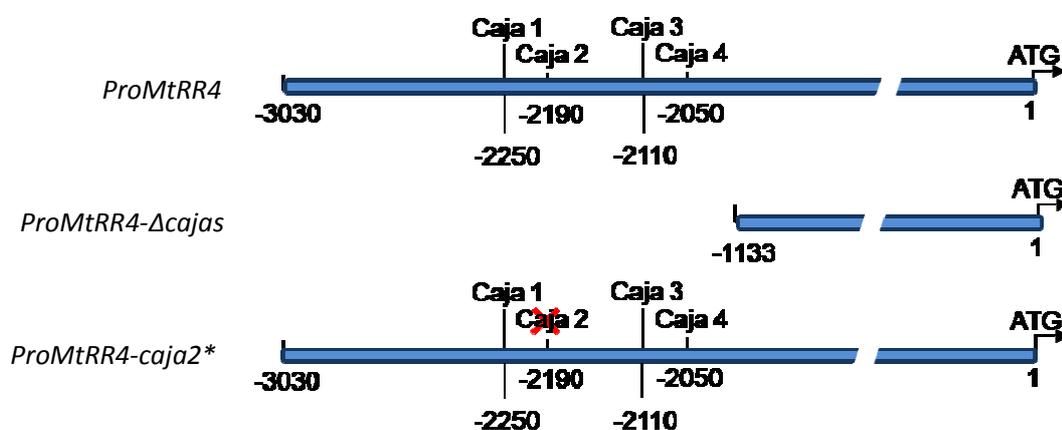


Figura 2.8. Las Cajas 1 a 4 son reconocidas *in planta* en respuesta a las citoquininas. A) Gel de retardo con extractos nucleares de raíces en condiciones control o tratados con BAP 10^{-7} M durante 3 h, con los oligonucleótidos con secuencia central de las Cajas indicadas en cada calle. B) Ensayo de competencia usando los mismos extractos que en A; no tratados (calle 2) o tratados (calles 3 a 5). El “*” indica el oligonucleótido marcado radiactivamente utilizado en la reacción de unión, competida con 20 veces más de oligonucleótido sin marcar, de secuencia indicada en la Figura 2 (Caja 2 y SELEXmut).

La relevancia de las Cajas 1 a 4 en el contexto del *ProMtRR4* fue evaluada mediante la eliminación y/o mutagénesis dirigida de las mismas en la construcción *ProMtRR4:GUS*. La actividad del promotor completo de *MtRR4* (*ProMtRR4* de 2,8 kpb) fue comparada con una versión más corta del mismo que elimina las cuatro Cajas (*ProMtRR4-Δcajas*, de 993 pb) y con una versión completa en la que el núcleo central GAGA/TCTC de la Caja 2 se mutagenizó (*ProMtRR4-caja2**) (Figura 2.9A). Cada construcción fue utilizada para transformar raíces de *M. truncatula*, y la actividad GUS de cada raíz individual fue medida antes y después del tratamiento de 3 h con BAP 10^{-7} M (Figura 2.9B). La actividad GUS

dirigida por la construcción *ProMtRR4:GUS* se incrementó aproximadamente 10 veces por el tratamiento. Por el contrario, la actividad dirigida por la construcción *ProMtRR4-Δcajas:GUS* no se alteró perceptiblemente ante la exposición a BAP. Por último, la versión *ProMtRR4-caja2** del promotor mostró sólo una respuesta residual al tratamiento con BAP, indicando que este elemento *cis* es activo y absolutamente necesario para la regulación transcripcional de *MtRR4* por las citoquininas.

A



B

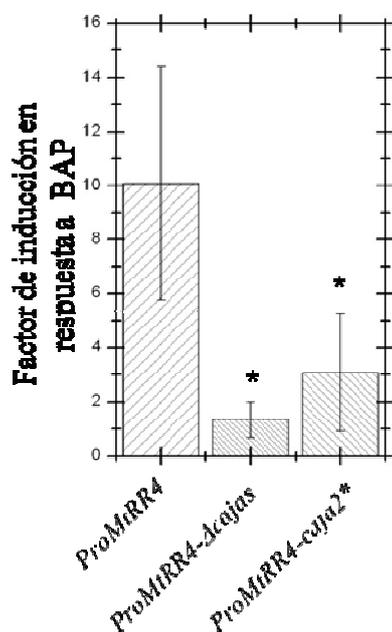


Figura 2.9. Se requieren las Cajas 1 a 4 para la activación de la transcripción de *MtRR4* por citoquininas. A) Representación esquemática de las diferentes versiones del *ProMtRR4* fusionadas al gen reportero *GUS*. *ProMtRR4* comprende aproximadamente 3 kpb corriente arriba del ATG; *ProMtRR4-caja2** corresponde a un promotor del mismo tamaño, pero con la Caja 2 mutagenizada de la misma manera que la Caja SELEXmut; *ProMtRR4-Δcajas* es una versión corta del promotor utilizada como control negativo porque carece de las cuatro cajas. B) Cuantificación fluorométrica de la actividad de la proteína GUS en las raíces de *M. truncatula* transformadas con las construcciones descritas en (A). Las barras representan el promedio de la relación entre las medidas tomadas de raíces individuales antes y después de la inducción por BAP (10^{-7} M, 3 h). Las barras de error representan el error estándar de la media, y sólo uno de los dos replicados biológicos está graficado. Se utilizó un test Kruskal-Wallis para determinar las diferencias significativas ($p < 0,05$; $n > 10$).

La expresión de *MtRR4* aumenta en respuesta a la simbiosis con *S. melitoli* (González-Rizzo y col., 2006). Con el objeto de caracterizar el patrón de expresión de *MtRR4* en detalle durante la nodulación utilizamos la construcción que comprende al promotor completo, *ProMtRR4:GUS* (Figura 2.10). Los resultados de los ensayos de histoquímica indicaron que *MtRR4* se transcribe desde etapas tempranas de la nodulación en las células en división del periciclo y de la corteza interna, y que a medida que el órgano madura, la expresión se localiza en la región I (Vasse y col., 1990), en la cual también se localiza el meristema.

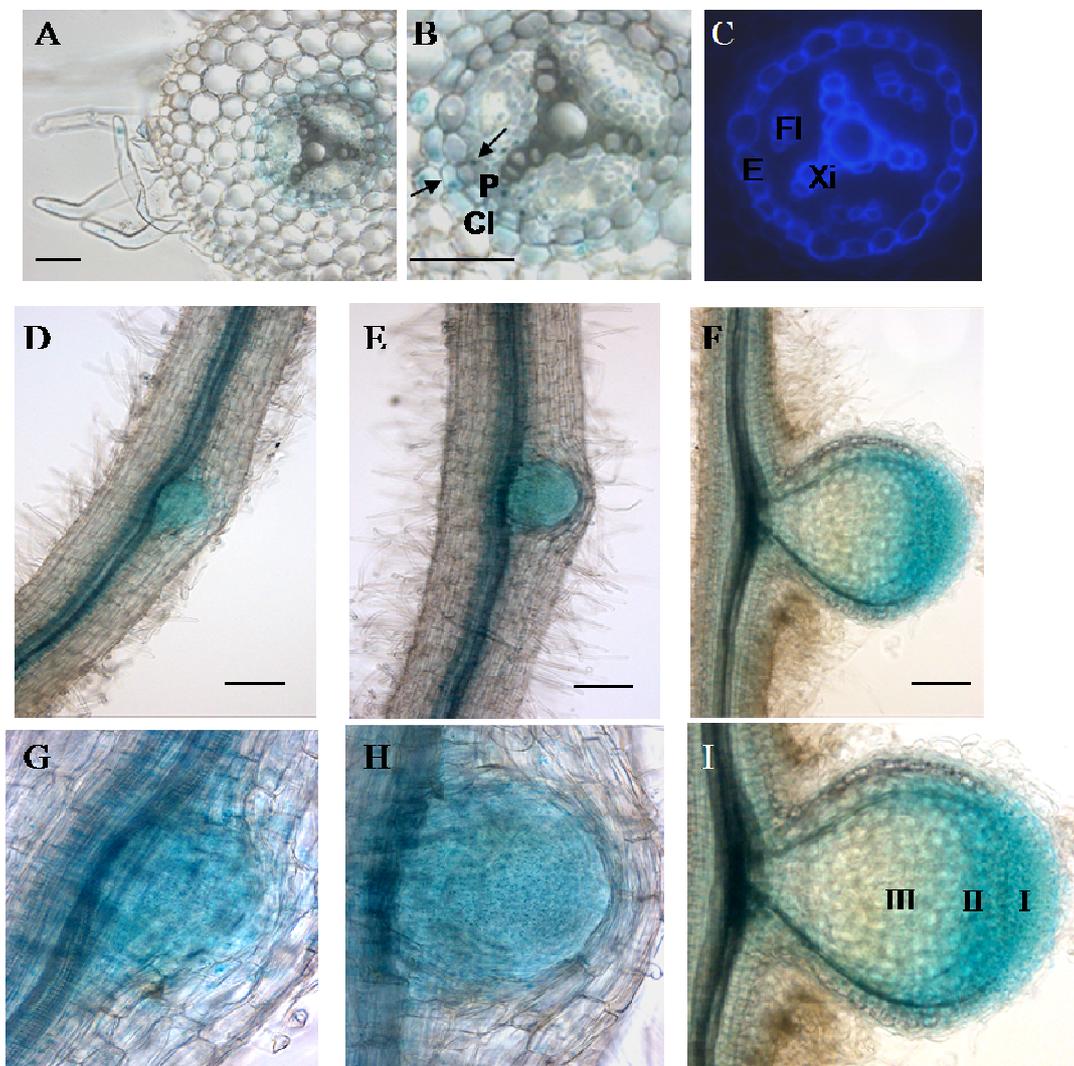


Figura 2.10. Patrón de expresión de *MtRR4* durante la nodulación. Localización de la expresión de *MtRR4* detectada por histoquímica de raíces transformadas con la construcción *ProMtRR4:GUS*. A-C) Cortes transversales de la raíz teñida 3 días post inoculación (dpi) con *S. melitoli*. A y B son fotos en campo claro. C corresponde a la auto fluorescencia de la foto B con un filtro de excitación de 340-380 nm y uno de emisión de 450-490 nm, destacando la endodermis (E) y los tejidos vasculares (Xi: xilema; Fl: floema). Las flechas señalan la expresión en el periciclo (P) y en las células de la corteza interna (CI). D-I) Cortes longitudinales de raíces (D) 3, (E) 5 y (F) 7 dpi. Las imágenes G, H e I corresponden a acercamientos de las fotos D-G. Las zonas de los nódulos indican I: meristema; II: infección/diferenciación; III: fijación de nitrógeno (Vasse y col., 1990). Las líneas de la escala representan 50 μm en A-C y 150 μm en D-F.

Con el propósito de establecer si estos elementos *cis* identificados en el *ProMtRR4* eran activos durante la nodulación, comparamos cualitativamente la actividad GUS dirigida por las construcciones *ProMtRR4* y *ProMtRR4- Δ cajas* (que presentan las dos situaciones más contrastantes) durante un contexto de desarrollo por histoquímica (Figura 2.11). *ProMtRR4:GUS* generó una señal asociada al primordio de los nódulos simbióticos mientras que en raíces transformadas con la construcción *ProMtRR4- Δ cajas:GUS* esta señal fue indetectable. Este resultado sugirió que la región ubicada corriente arriba de los primeros 993 pb del promotor sería la que contiene los elementos reguladores de la transcripción de *MtRR4* durante la organogénesis de los nódulos.

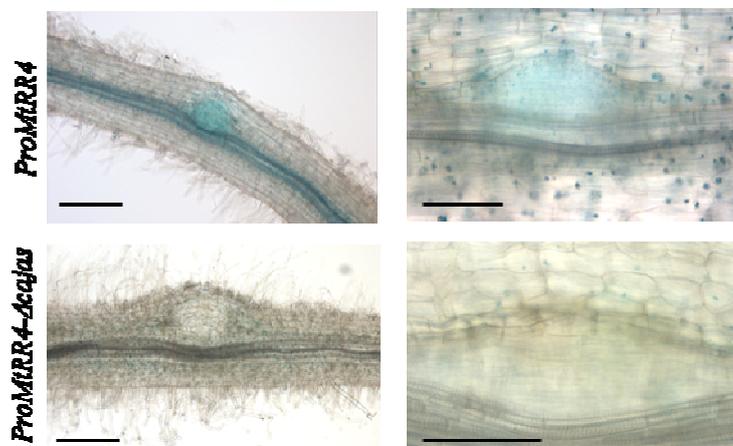


Figura 2.11. Las Cajas 1 a 4 regulan la expresión de *MtRR4* durante la nodulación. Tinción histoquímica de la actividad GUS en las raíces transformadas con las construcciones *ProMtRR4* y *ProMtRR4-Δcajas*, 3 dpi. Las líneas de la escala representan 150 μ m en las imágenes de la izquierda y 50 μ m en las de la derecha.

Identificación de los elementos *cis* reconocidos por RRs de Tipo B en los promotores de los genes regulados por citoquininas

Contando con una colección de transcritos regulados por las citoquininas en las raíces de *M. truncatula*, la identificación de los elementos *cis* activos del *ProMtRR4* cobró una gran importancia como herramienta potencial para establecer una relación entre la acción de las citoquininas y la organogénesis de los nódulos simbióticos. Dada la desorganización que aún impera en las bases de datos de *Medicago truncatula*, en constante formación, hemos necesitado desarrollar en forma conjunta con el grupo de trabajo de Jérôme Gouzy (INRA-Toulouse, Francia) una herramienta bioinformática (disponible actualmente en <http://www.legoo.org/>, también utilizada en el trabajo del Capítulo 1) que permitiera la identificación de los genes regulados por citoquininas que contengan en sus secuencias promotoras Cajas similares al consenso del SELEX de *MtRR1*. En una primera

aproximación, se buscaron los núcleos de 8 pb mejor conservados entre las Cajas 1 a 4 y el consenso del SELEX. Las secuencias exactas de búsqueda se detallan en la Tabla 2.2.

Caja	Secuencia
Caja 1	AACGAGAC
Caja 1 RC	GTCTCGTT
Caja 2	AATGAGAC
Caja 2 RC	GTCTCATT
Caja 3-4	ATAGAGAC
Caja 3-4 RC	GTCTCTAT
Caja 5	ATGAGATT
Caja 5 RC	AATCTCAT
Caja 6	ATGAGACT
Caja 6 RC	AGTCTCAT
Caja 7	ATAAGATT
Caja 7 RC	AATCTTAT

Tabla 2.2. Secuencias de 8 pb de las Cajas derivadas del consenso del SELEX, considerando sus posiciones variables, y las Cajas 1 a 4 del *ProMtRR4*. RC indica la secuencia de la hebra reversa y complementaria. Cabe destacar que los 8 pb utilizados para la búsqueda coinciden en las Cajas 3 y 4 del *ProMtRR4*. Las Cajas 5 a 7 corresponden a variantes del consenso del SELEX en las posiciones 4 y 8 de la secuencia consenso 5'-AAT(G/A)AGA(C/T)TAGT-3'.

De los 942 genes regulados por citoquininas, detectados con un criterio de baja astringencia (valor $p < 0,05$), sólo 584 están codificados en la región conocida del genoma de *M. truncatula*, por lo que se pudo obtener sus secuencias promotoras. La comparación entre este grupo de promotores y otro conformado por promotores de genes no regulados por citoquininas elegidos al azar mostró que existe un enriquecimiento significativo en el primer grupo respecto a la cantidad de promotores que contengan más de una Caja derivada del SELEX. Establecimos entonces una condición adicional para aplicar un criterio más selectivo: que los promotores tuvieran al menos 2 cajas en su secuencia (Anexo 1, Tabla 2.2). Asimismo y teniendo en cuenta que la Caja 2 es la más parecida al consenso del SELEX y que los estudios de mutagénesis dirigida determinaron que es esencial para la regulación por citoquininas, definimos como criterio adicional para la búsqueda que los promotores contengan al menos una Caja 2 y otra de 8 pb derivada del consenso (2 cajas en total; Anexo 1, Tabla 2.3). *MtRR4* fue el control positivo de la búsqueda, y se detectaron otros 38 genes que cumplían con el criterio (unión de las Tablas 2.2 y 2.3 del Anexo 1). De

éstos, seis eran FTs inducidos por citoquininas de las familias GRAS, LOB, bZip (del inglés, basic LEUCINE ZIPPER), AP2/ERF y NAM (del inglés, NO APICAL MERISTEM; todos indicados en la Tabla 2.3). Un resultado interesante derivado de este análisis fue que uno de los FTs de la familia GRAS correspondía a MtNSP2 (con 3 cajas), que cumple un rol fundamental en la organogénesis de los nódulos. Vale destacar que la octava posición de la Caja repetida en forma idéntica 2 veces (llamada Caja 5, de secuencia AATGAGAT/ATCTCATT) está ocupada por una T en lugar de una C, coincidiendo con la segunda opción mejor representada en el consenso del SELEX para dicha posición.

Teniendo en cuenta la relevancia de MtNSP2 en la nodulación, además de que 11 pb de las cajas presentes en su promotor son idénticas en ambos casos y coinciden con el consenso del SELEX, decidimos por último determinar un nuevo criterio de búsqueda, para evitar perder genes blanco en la lista de candidatos: que los promotores cuenten con una Caja 5 y otra más de 8 pb derivada del consenso del SELEX (Anexo 1, Tabla 2.4). De esta nueva búsqueda, se obtuvo una lista de 9 genes inducidos por citoquininas, incluyendo un FT de la familia bHLH, así como también dos homólogos de genes de respuesta primaria a citoquininas de Arabidopsis (Taniguchi y col., 2007), que codifican una GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST) y una CITOQUININA OXIDASA/DEHIDROGENASA (CKX; todos ellos en la Tabla 2.3).

En conclusión, la combinación de estas tres búsquedas diferentes permitió identificar 56 genes (inducidos o reprimidos) candidatos a ser de respuesta primaria a citoquininas, entre los cuales dos son homólogos de genes de respuesta primaria a citoquininas en Arabidopsis. Entre los nuevos 31 genes inducidos por citoquininas que surgieron de las búsquedas, siete codifican FTs que nunca habían sido relacionados a las vías de señalización de citoquininas (Tabla 2.3).

Nº de Acceso	Caja 2	Caja 5	Nº total de Cajas	MTGI8	FC	Valor p ajustado	Descripción
--------------	--------	--------	-------------------	-------	----	------------------	-------------

Medtr5g037580.1	1	0	5	TC103991	11,12	0,00003	RR de Tipo A (MtRR4)
-----------------	---	---	---	----------	-------	---------	----------------------

Genes que codifican FTs, con al menos 3 Cajas derivadas del consenso del SELEX							
Medtr3g097800.1	0	2	3	TC98097	3,98	0,00055	FT de la familia GRAS (MtNSP2)
Medtr5g069060.1	1	1	3	TC103195	1,76	0,00049	FT de la familia ERF (patogénesis)
Medtr7g005040.1	0	0	4	TC95048	1,6	0,00056	FT de la familia NAM

Genes que codifican FTs, con al menos 1 Caja 2 y otra adicional derivada del consenso del SELEX							
Medtr1g135030.1	1	0	2	TC98397	3,46	0,00441	FT de la familia LOB
Medtr2g116970.1	1	0	2	TC109615	1,9	0,00103	FT de la familia GRAS
Medtr5g069060.1	1	1	4	TC103195	1,76	0,00049	FT de la familia ERF (patogénesis)
Medtr4g097530.1	1	0	2	AW684462	1,73	0,00017	FT de la familia bZIP

Genes que codifican FTs, con al menos 1 Caja 5 y otra adicional derivada del consenso del SELEX							
Medtr3g097800.1	0	2	3	TC98097	3,98	0,00055	FT de la familia GRAS (MtNSP2)
Medtr5g014710.1	0	1	2	TC95476	1,92	0,02654	FT de la familia bHLH

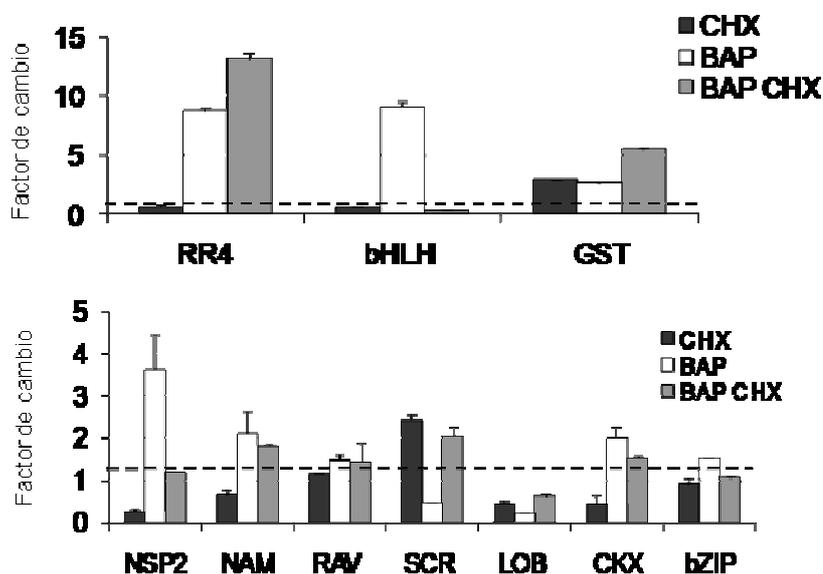
Genes homólogos de aquellos de respuesta primaria a citoquininas en Arabidopsis							
Medtr4g135740.1	0	2	2	TC95247	1,78	0,0349	Glutación S-transferasa
Medtr1g019530.1	0	1	2	TC95407	1,63	0,00748	Citoquinina oxidasa

Tabla 2.3. Genes regulados por citoquininas e identificados por los elementos *cis* en sus promotores. Lista de genes que codifican FTs regulados por citoquininas (ensayo de microarreglos; |Factor de Cambio| > 1,5; Valor p ajustado < 0,001; Promedio A > 7), que contienen en sus promotores (2,5 kpb) ya sea más de 3 Cajas derivadas del consenso del SELEX, o 2 Cajas de las cuales al menos 1 sea la Caja 2 o la Caja 5. Al final también se detallan los 2 genes homólogos de aquellos identificados en *Arabidopsis* por su respuesta primaria (Tanigushi y col., 2007) y con más de dos Cajas. Para cada gen, se indica el Número de Acceso (basado en IMG-Mt3); la cantidad de Cajas 2 o 5 y el total de Cajas derivadas del consenso del SELEX presentes en el promotor; el Número de Acceso del transcripto TC (del inglés, Tentative Consensus, basado en TIGR/MtGI8); el Factor de Cambio (FC) y el Valor p Ajustado; así como la descripción de su mejor homología, basada en el BlastX con la base de datos de NCBI).

Las cajas del *ProMtNSP2* son funcionales y necesarias para la regulación por citoquininas durante el proceso de nodulación

La búsqueda basada en los elementos *cis* generó una lista de genes de respuesta primaria putativa a citoquininas. Analizamos entonces los niveles de expresión de estos genes en respuesta a esta fitohormona en ausencia y presencia de CHX en las raíces de *M. truncatula*. Incluimos en el análisis a los dos genes homólogos de *CKX* y *GST* de Arabidopsis, y al RR de Tipo A, *MtRR4*. Todos los genes analizados resultaron estar regulados por el tratamiento corto de citoquininas (BAP 10^{-7} M, 1 h). De los diez genes analizados, *MtRR4* y otros tres genes candidatos mostraron una inducción independiente de la síntesis proteica *de novo*. Estos tres genes fueron el homólogo de *GST* de Arabidopsis de respuesta primaria y 2 genes que codifican FTs de las familias NAM y RAV, respectivamente (Figura 2.12A). La expresión de los otros genes fue reprimida por la CHX por sí sola (*NSP2*, *LOB*, *CKX*) o por las citoquininas (*LOB*, *SCR*), dificultando arribar a una conclusión acerca del tipo de respuesta que los caracteriza. Los FTs bHLH y b-Zip mostraron una respuesta claramente secundaria al tratamiento con citoquininas.

A



B

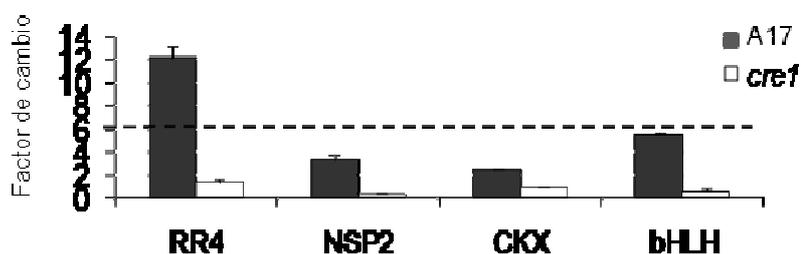


Figura 2.12. Caracterización de los nuevos genes de respuesta a citoquininas en *M. truncatula*. Cuantificación de la expresión relativa de los genes por RT-PCR en tiempo real en raíces tratadas con BAP 10^{-7} M durante 1 h, con o sin CHX $50 \mu\text{M}$ en raíces salvajes (A) o en plantas mutantes *cre1-1* (B). Tres genes fueron utilizados como referencia definidos por el programa Genorm, como no regulados por BAP, ni CHX ni desregulados en la mutante *cre1-1* (ver Materiales y Métodos). Los valores de expresión fueron normalizados con los valores de los mismos genes en plantas no tratadas. Las líneas punteadas definen en valor 1 para cada caso. Las barras de error representan la desviación estándar entre dos replicados técnicos, y se graficó un replicado biológico de cuatro.

Teniendo en cuenta que la vía de transducción de señales de citoquininas dependiente MtCRE1 es crucial en la regulación del desarrollo de las raíces y de la nodulación (González-Rizzo y col., 2006), la expresión de los genes elegidos se analizó en la planta mutante *cre1-1* (con un codón STOP en el dominio kinasa). Además de *MtRR4*, los genes que codifican la CKX, y los FTs bHLH y NSP2 resultaron dependientes de la activación de MtCRE1 (Figura 2.12B).

De estos genes, elegimos al que codifica el FT MtNSP2, involucrado en la nodulación, para un estudio más profundo de los elementos *cis* presentes en su región promotora. El *ProMtNSP2* presenta una estructura similar a la de *ProMtRR4*, con una organización en tándem de 2 Cajas 5 separadas por 19 pb (Figura 2.13).

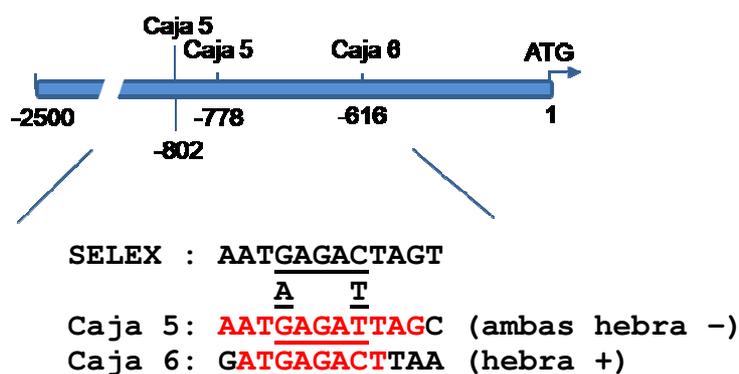


Figura 2.13. Esquema del *ProMtNSP2*. En el esquema se ubican las tres Cajas similares al consenso del SELEX, dos Cajas 5 y una Caja 6, y el número indica la posición del primer nucleótido respecto al ATG. El alineamiento de las secuencias correspondientes se ubica debajo del esquema. Los nucleótidos idénticos al consenso están remarcados en rojo. Las posiciones idénticas en todas las secuencias se muestran subrayadas. La indicación “hebra +/-” se refiere al sentido en el que la secuencia se ubica en el promotor.

Este promotor presenta además un elemento *cis* adicional (Caja 6) en la región promotora proximal. En total, las Cajas 5 y 6 y sus bases aledañas muestran entre un 66 % y un 92 % de identidad (8 a 11 pb de las 12) respecto al consenso del SELEX. Se hicieron nuevos ensayos de retardo en geles que mostraron que MtRR1 es capaz de reconocer a las

Cajas 5 y 6 *in vitro*, aunque menos eficientemente que a la Caja 2 y al consenso del SELEX (Figura 2.14).

GST-RR1	+	+	+	+	+	+	+	+
SELEX*	+							
Caja n°*		1	2	3	4	5	6	
SELEXmut*								+

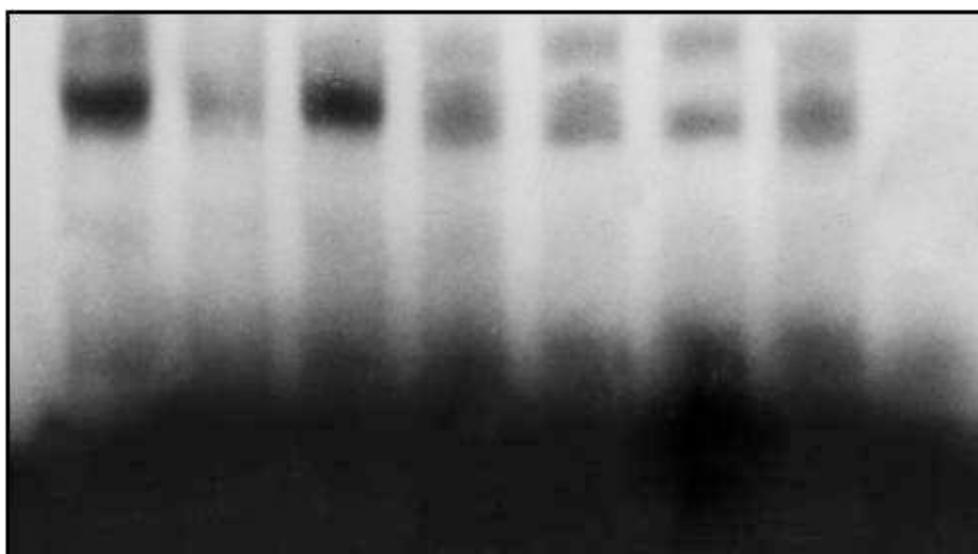


Figura 2.14. Ensayo de retardo en gel para la comparación de la unión de MtRR1 *in vitro* a los oligonucleótidos de secuencia central de 12 pb correspondientes al consenso del SELEX, las Cajas 1 a 4 del *ProMtRR4*, y las Cajas 5 y 6 del *ProMtNSP2*. Las secuencias marcadas radiactivamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ están indicadas con un “*”. Como control de la especificidad de unión se utilizó un oligonucleótido en el que el núcleo central del consenso del SELEX GAGA/TCTC fue reemplazado por la secuencia ACTG/CAGT (SELEXmut).

Se realizaron también ensayos con extractos nucleares y éstos indicaron que la Caja 5, pero no la Caja 6, es mejor reconocida cuando las raíces son tratadas con BAP. De todos modos, para la Caja 6 también existe una banda de retardo semejante a las otras (Figura 2.15A). La especificidad de unión para la Caja 5 fue evaluada de forma similar a la aplicada para la Caja 2: compitiendo la unión con una concentración 20 veces mayor de

oligonucleótidos sin marcar con la secuencia de la Caja 5 o el núcleo central mutagenizado, SELEXmut (Figura 2.15B).

A

Núcleos Control		+		+	
Núcleos BAP			+		+
Caja 5*	5	5	5	6	6



B

Núcleos Control		+		+	+
Núcelos BAP			+	+	+
Caja 5*	+	+	+	+	+
Caja 5				+	
SELEXmut					+

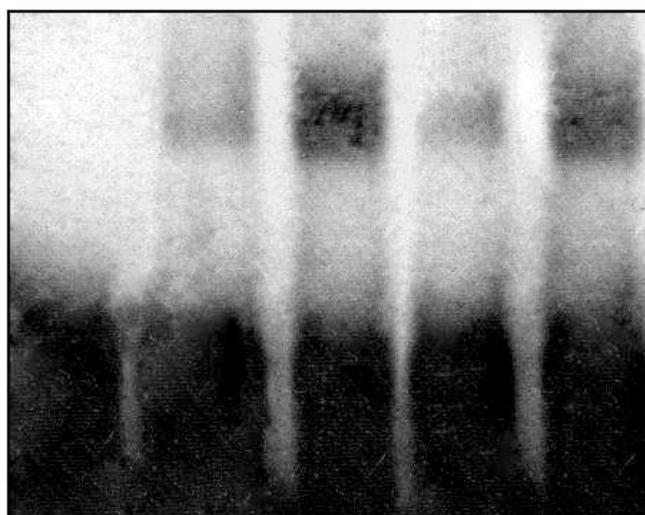
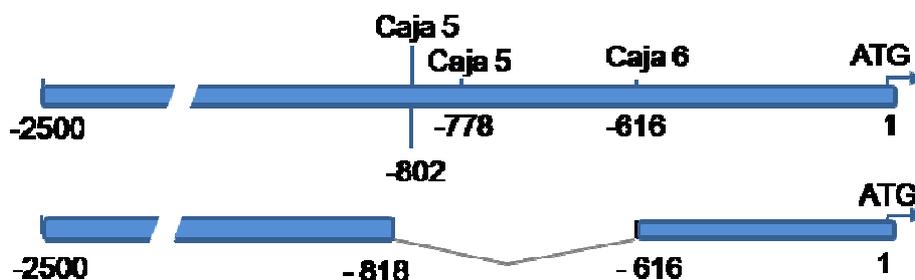


Figura 2.15. Las Cajas 5 y 6 son reconocidas *in planta*, y la unión a la Caja 5 aumenta en respuesta a las citoquininas. A) Gel de retardo con extractos nucleares de raíces en condiciones control o tratados con BAP 10^{-7} M durante 3 h con los oligonucleótidos con secuencia central de las Cajas indicadas en cada calle. B) Ensayo de competencia usando extractos (ídem A) control (calle 2) o tratados (calles 3 a 5). El “*” indica el oligonucleótido marcado radiactivamente utilizado en la reacción de unión, competida con 20 veces más de oligonucleótido sin marcar, de secuencia indicada en la Figura 2 (Caja 5 y SELEXmut).

Finalmente, para analizar la relevancia de estas cajas *in vivo* se transformaron raíces con las construcciones *ProMtNSP2:GUS* y *ProMtNSP2-Δcajas:GUS* (Figura 2.16A). Los ensayos de fluorimetría realizados con extractos proteicos de raíces individuales antes y después de un tratamiento de 1 h con BAP 10^{-7} M indicaron que el *ProMtNSP2* era inducible por citoquininas, a diferencia de la versión *ProMtNSP2-Δcajas* (Figura 2.16B).

A



B

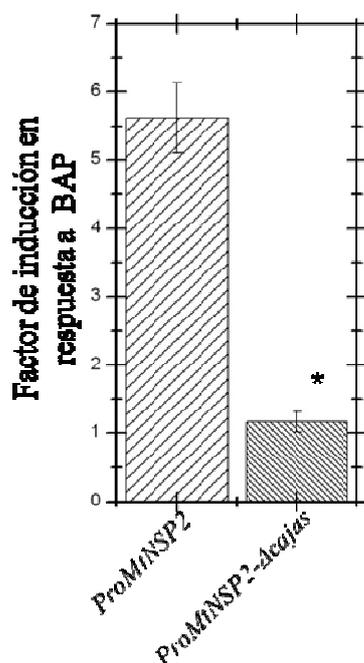


Figura 2.16. La región que contiene las Cajas 5 y 6 es necesaria para la activación de la transcripción de *MtNSP2* por citoquininas. A) Representación esquemática de las diferentes versiones del *ProMtNSP2* fusionadas al gen reportero *GUS*. *ProMtNSP2* comprende aproximadamente 3 kpb corriente arriba del ATG; *ProMtNSP2-Δcajas* es una versión quimérica del promotor que excluye a las tres Cajas. B) Cuantificación fluorométrica de la actividad de la proteína GUS en las raíces de *M. truncatula* transformadas con las construcciones descritas en (A). Las barras representan el promedio de la relación entre las medidas tomadas de raíces individuales antes y después de la inducción por BAP (10^{-7} M, 3 h). Las barras de error representan el error estándar de la media, y sólo uno de los dos replicados biológicos está graficado. Se utilizó un test Kruskal-Wallis para determinar las diferencias significativas ($p < 0,05$; $n > 10$).

La regulación de estas fusiones transcripcionales fue analizada en condiciones simbióticas. Sólo la construcción *ProMtNSP2:GUS* dirigió la expresión al primordio de los

nódulos, mientras que la actividad GUS no fue detectada al ser dirigida por la versión *ProMtNSP2-Δcajas* (Figura 2.17).

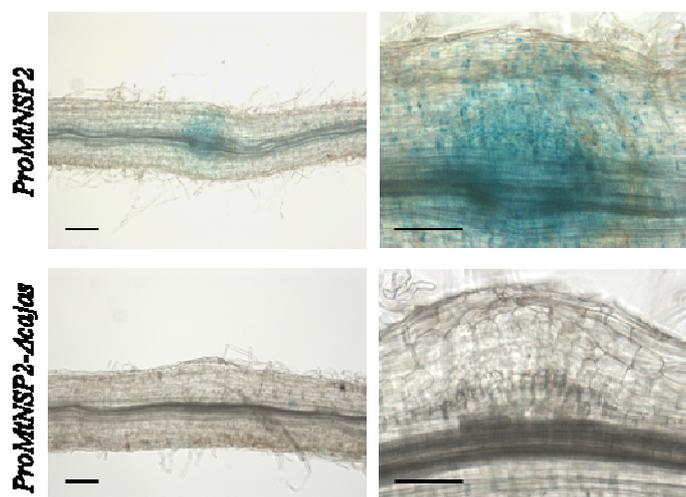


Figura 2.17. La región que contiene las Cajas 5 y 6 regula la expresión de *MtNSP2* durante la nodulación. Tinción histoquímica de la actividad GUS en las raíces transformadas con las construcciones *ProMtNSP2* y *ProMtNSP2-Δcajas*, 3 dpi. Las líneas de la escala representan 150 μm en las imágenes de la izquierda y 50 μm en las de la derecha.

Podemos concluir entonces que los elementos *cis* presentes en el promotor de *MtNSP2* son reconocidos *in vitro* por MtRR1 y que la región que los comprende es a su vez necesaria para la expresión de *MtNSP2* durante la organogénesis de los nódulos simbióticos.

Discusión

Gracias a la combinación de estrategias bioquímicas, moleculares, transcriptómicas e informáticas hemos logrado identificar nuevos elementos *cis* reconocidos por RRs de Tipo B y un grupo de FTs inducidos por citoquininas en las raíces de *Medicago truncatula*, que presentan dichos motivos en sus secuencias promotoras. Entre estos genes encontramos a *MtNSP2*, un regulador crucial de la organogénesis de los nódulos simbióticos, y

demostramos que la región promotora, que contiene los elementos *cis* identificados, es necesaria para la activación por citoquininas y para su expresión durante la nodulación.

Para identificar blancos directos de los RRs de Tipo B involucrados en la señalización de las citoquininas en las leguminosas, llevamos a cabo un análisis transcripcional en los ápices de las raíces de *M. truncatula*. Es la primera vez que se realiza este tipo de análisis utilizando una región tan específica de una planta. De este estudio surgieron muchos genes homólogos de aquéllos identificados en *Arabidopsis* como regulados por citoquininas en plántulas completas (Rashotte y col., 2003; Kiba y col., 2007; Tanigushi y col., 2007). Este resultado indica que varias vías de señalización detectadas en plántulas enteras también tienen lugar específicamente en los ápices de las raíces. A su vez, identificamos vías funcionales más significativamente enriquecidas en estos tejidos, como aquellas relacionadas a las giberelinas (GA) y los flavonoides. Los análisis transcripcionales previos en *Arabidopsis* habían indicado que existe una relación entre las citoquininas y el metabolismo y la respuesta de las GA. De hecho, dos genes involucrados en la biosíntesis de GA (la OXIDASA GA20 y la 3 β -HIDROXILASA GA4) se reprimen en forma rápida por citoquininas, mientras dos genes que codifican reguladores negativos de la transducción de las señales de las GA (GAI y RGA) se inducen (Kiba y col., 2005; Brenner y col., 2005). Nuestro análisis sugiere que la expresión de varios genes que codifican OXIDASAS y β -HIDROXILASAS relacionadas con el metabolismo de las GA se induce por un tratamiento corto con citoquininas exógenas en los ápices de las raíces de *M. truncatula*. Según el conocimiento actual, las GAs y las citoquininas tienen roles opuestos en los meristemas del tallo y de la raíz de *Arabidopsis* (Greenboim-Wainberg y col., 2005; Alabadi y col., 2009). En esta especie las GAs regulan positivamente el crecimiento radicular, y en las leguminosas la formación de raíces laterales y nódulos (Greenboim-Wainberg y col., 2005; Ferguson y col., 2005; Achard y col., 2009; Maekawa y col., 2009).

Hasta el momento no se había encontrado una conexión entre las citoquininas y el metabolismo de los flavonoides. En este estudio se detectaron varios genes involucrados en las vías metabólicas de diferentes tipos de flavonoides como inducidos por el tratamiento corto de citoquininas. Entre estos genes, diez participan en las vías de señalización de los

isoflavonoides, cuatro de la chalcona / flavona, tres de los flavanones y tres de los flavonoles. Este resultado pone en evidencia la existencia de un rol en la activación de las vías dependientes de los flavonoides en las raíces ejercido por las citoquininas. El hecho de no haber sido detectada una relación entre citoquininas y flavonoides en *Arabidopsis* puede deberse a distintas razones. Por un lado, en los análisis hechos en *Arabidopsis* fueron utilizadas plántulas enteras, lo cual podría estar diluyendo las señales diferenciales y/o, alternativamente, esta relación podría ser específica de las leguminosas. Los flavonoides juegan un papel fundamental en las etapas tempranas de la interacción simbiótica con las bacterias en la organogénesis de los nódulos, ya sea en la activación de la producción de los factores Nod en *rhizobium* o a través de la regulación del transporte polar de las auxinas (Wasson y col., 2006; Oldroyd y Downie, 2008). Las vías de las auxinas actúan corriente abajo de las de citoquininas dependientes de MtCRE1 durante la iniciación de los nódulos (Plet y Frugier., resultados no publicados), y la activación del metabolismo de los flavonoides a través de las citoquininas podría requerir regular el transporte polar de las auxinas durante las etapas tempranas de la nodulación. Finalmente, aunque no se detectó un enriquecimiento en genes relacionados con las auxinas en nuestro análisis, varios genes reguladores claves en la señalización y transporte de las auxinas sí aparecieron como inducidos en las raíces de *M. truncatula* tratadas con citoquininas. Entre ellos, cuatro AUX/IAA (incluyendo IAA4, MtGI8TC106756; IAA16, TC100707; SHY2/IAA3, TC110388 y TC106758; IAA28, TC102735), un homólogo de ARF4 (del inglés, AUXIN RESPONSE FACTOR, TC107229) y un homólogo del transportador PIN (TC96992). Este resultado está en concordancia con un descubrimiento reciente que indica que existe un diálogo entre las vías de las auxinas y las citoquininas en las raíces de *Arabidopsis* (Delle Ioio y col., 2008; Ruzicka y col., 2009).

En cuanto a los FTs que pueden actuar como reguladores globales de procesos del desarrollo de las raíces, se notó un enriquecimiento en genes de la familia bHLH y AP2/ERF. Los análisis transcripcionales previos llevados a cabo en plántulas de *Arabidopsis* revelaron que al menos tres FTs de la familia bHLH se inducen por citoquininas, y uno se reprime (Hoth y col., 2003; Kiba y col., 2005; Brenner y col., 2005; Séguéla y col., 2008). En cuanto a la familia AP2/ERF, varios genes de *Arabidopsis* fueron

inducibles por citoquininas, además de los miembros de la subfamilia CRF (Rashotte y col., 2003; Hoth y col., 2003; Kiba y col., 2005; Brenner y col., 2005). Ninguno de los genes de las familias bHLH o AP2/ERF identificados en *M. truncatula* resultó estar muy relacionado filogenéticamente con aquellos identificados en Arabidopsis. Esto sugiere que las leguminosas cuentan con una regulación diferente de las familias de FTs en respuesta a las citoquininas. Además, es razonable pensar que el requerimiento de los CRF en la señalización de las citoquininas en plántulas sea diferente que los ápices de las raíces.

El objetivo principal de este trabajo fue el de identificar un grupo de genes regulados por citoquininas a través de los FTs RR de Tipo B en las raíces de las leguminosas. Persiguiendo un objetivo similar en Arabidopsis se pudo identificar la secuencia de ADN reconocida por varios RRs de Tipo B (ARR1, ARR2, ARR10 y ARR11), llegando al consenso de 5 pb 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' (Sakai y col., 2000; Lohrmann y col., 2001; Hosoda y col., 2002; Imamura y col., 2003; Heyl y Schmülling, 2003). La secuencia de 12 pb identificada en nuestro estudio (5'-AAT(G/A)AGA(C/T)TAGT-3') incluye el núcleo central de 5 pb 5'-AGATT-3', pero significativamente expandido gracias al exitoso resultado del SELEX. Esta estrategia nos permitió llevar adelante búsquedas bioinformáticas confiables de genes potenciales de respuesta primaria a citoquininas. Basados en el criterio de un enriquecimiento en elementos *cis* del tipo del SELEX en los promotores de los genes regulados por citoquininas, pudimos encontrar varios genes de respuesta primaria. Entre ellos, al RR de Tipo A *MtRR4*, además de dos genes homólogos a genes de respuesta primaria en Arabidopsis (*CKX* y *GST*; Tanigushi y col., 2007). No identificamos ningún otro RR de Tipo A ya que éstos o no fueron contemplados en el ensayo de microarreglos 16K+ o bien su secuencia promotora se desconoce aún, como es el caso de *MtRR5* (González-Rizzo y col., 2006). Buscando en forma sistemática los homólogos de genes de respuesta primaria en Arabidopsis (Tanigushi y col., 2007) encontramos seis genes adicionales que poseían en su secuencia promotora al menos una caja similar al consenso del SELEX de 8 pb, y eran regulados por citoquininas en las raíces de *M. truncatula* (Anexo 1, Tabla 2.5). De éstos, los casos más notorios son los de un gen que codifica un AUX-IAA muy cercano a

SHY2/IAA3 que contiene tres cajas en su promotor, y el de otro gen del tipo FACILINA AGP11 / ARABINOGALACTANO, que contiene dos cajas.

El RR de Tipo B MtRR1, involucrado en el proceso de nodulación y elegido para la estrategia de SELEX está cercanamente relacionado a ARR10 de Arabidopsis. El núcleo reconocido por ARR10 es AGATT/AATCT (Hosoda y col., 2002) y está incluido en la Caja 5 (ATGAGATT/AATCTCAT), definida en nuestra búsqueda en promotores. La Caja 5 fue encontrada en los promotores de los genes de *M. truncatula* *GST*, *CKX* y *FASCILINA*, homólogos de genes de respuesta primaria en Arabidopsis. El elemento *cis* más relevante en el *ProMtRR4* por su proximidad al consenso del SELEX, por la preferencia de unión por MtRR1 *in vitro*, y por su actividad comprobada *in planta*, es la Caja 2 (5'-AATGAGAC-3'). Esta Caja diverge más que la Caja 5 del consenso reconocido por los RRs de Tipo B en Arabidopsis. Sin embargo, la Caja 2 también se encuentra presente en los promotores de algunos genes homólogos a aquellos de respuesta primaria en Arabidopsis, tales como aquellos que codifican DRs (del inglés, DISEASE RESISTANCE), SHY2/AUX-IAA y el CITOCROMO P450 (Anexo 1, Tabla 2.5). La comparación de la eficiencia de unión de MtRR1 a las Cajas 2 y 5 (Figura 2.14) sugiere que este FT prefiere una G en la quinta posición en la secuencia 5'-ACTA(G/A)TCTCATT-3'. De acuerdo a lo postulado por Tanigushi y col. (2007), la extensión de las secuencias fuera del núcleo central podría ser determinante para el reconocimiento por los RRs de Tipo B. Esta hipótesis sugiere que la Caja 5 podría ser reconocida por otro MtRR de Tipo B en lugar de por MtRR1. Más globalmente, se podría plantear que diversos RRs de Tipo B presentes en *M. truncatula* reconocen secuencias derivadas del consenso del SELEX, con el fin de regular diferentes grupos de genes. Además, es notorio que en los dos promotores estudiados en detalle, los elementos *cis* se disponen en tándem, separados por 48 pb en el *ProMtRR4* y por 19 pb en el *ProMtNSP2*. Una disposición similar se encontró en los genes *MtNAM* y *MtGST*, incluidos en este trabajo (Figura 2.18). Esta característica indica que es probable que los RRs de Tipo B actúen en complejos de regulación comunes. El próximo paso en la dilucidación de estas maquinarias transcripcionales sería la identificación de qué RR reconoce cada elemento *cis*, así como qué interacciones tienen lugar entre las proteínas.

Para validar el tipo de respuesta de los genes identificados bioinformáticamente, seleccionamos siete que no presentaban una homología significativa con los descriptos en *Arabidopsis*. Hicimos uso del criterio de la inducción en presencia de CHX (considerado, por ejemplo, por Brandstatter y Kieber, 1998; Rashotte y col., 2003; Tanigushi y col., 2007), dada la preexistencia de los RRs de Tipo B y su activación por el sistema de FOSFOTRANSFERASAS. De estos siete genes, los de las familias *NAM* y *RAV* presentaron una respuesta primaria clara, sin necesidad de síntesis proteica *de novo*. Además, *MtRR4* y el homólogo de *GST* de *Arabidopsis*, también presentaron una respuesta primaria. Los demás genes homólogos a los de *Arabidopsis* se indujeron débilmente por citoquininas, haciendo difícil llegar a una conclusión acerca de su comportamiento en presencia de CHX. Estos resultados indican, al igual que los estudios previos en *Arabidopsis* (Riou-Khamlichi y col., 1999; Rashotte y col., 2003; Tanigushi y col., 2007), que el criterio basado en la dependencia de CHX puede resultar confuso para muchos casos, especialmente cuando la expresión del gen en estudio depende solamente de CHX, o cuando la inducción por el tratamiento es débil. Además, no se puede descartar que un gen que no presente inducción en presencia de CHX sea de todas formas un blanco directo del RR de Tipo B, ya que podría necesitar que otra proteína presente en el complejo transcripcional se traduzca.

Una característica propia de las leguminosas es su capacidad de interactuar simbióticamente con bacterias fijadoras de nitrógeno. Muchos genes involucrados en las etapas tempranas de la nodulación están regulados por citoquininas (Frugier y col., 2008), incluyendo un actor clave como *MtNIN* (del inglés, *NODULE INCEPTION*), cuya regulación depende de la vía de MtCRE1 / LHK1 (González-Rizzo y col., 2006; Murray y col., 2007). Cabe destacar que entre los genes candidatos a mostrar una respuesta primaria se encontraba *MtNSP2*, que codifica uno de los FTs más importantes que participa en las etapas tempranas de la nodulación, tanto en las células corticales como en las epidérmicas (Oldroyd y Downie, 2008). Los resultados aquí presentados muestran que los elementos *cis* presentes en el promotor de *MtNSP2* son reconocidos por MtRR1 *in vitro* y requeridos *in planta* tanto para la activación por citoquininas como para la expresión durante la nodulación temprana. Esto sugiere que la regulación directa de *MtNSP2* por las

citoquininas en la vía dependiente de MtCRE1 tiene lugar durante la interacción simbiótica. Hará falta profundizar los estudios que permitan dilucidar qué RR de Tipo B reconoce cada uno de estos elementos *cis*.

Existe la posibilidad de que los nuevos genes de respuesta primaria, tales como *CKX* y el FT *bHLH*, también dependientes de MtCRE1, estén involucrados en la nodulación. Otros FTs relacionados con la nodulación y que actúan corriente debajo de MtCRE1, son *MtERN1* (del inglés, *ERF REQUIRED FOR NODULATION*; Middleton y col., 2007) y *MtNIN* (Schauser y col., 1999). Aunque no se detectó un enriquecimiento en sus regiones promotoras de los núcleos derivados del consenso del SELEX, algunos elementos *cis* similares a éstos están presentes (Figura 2.18).

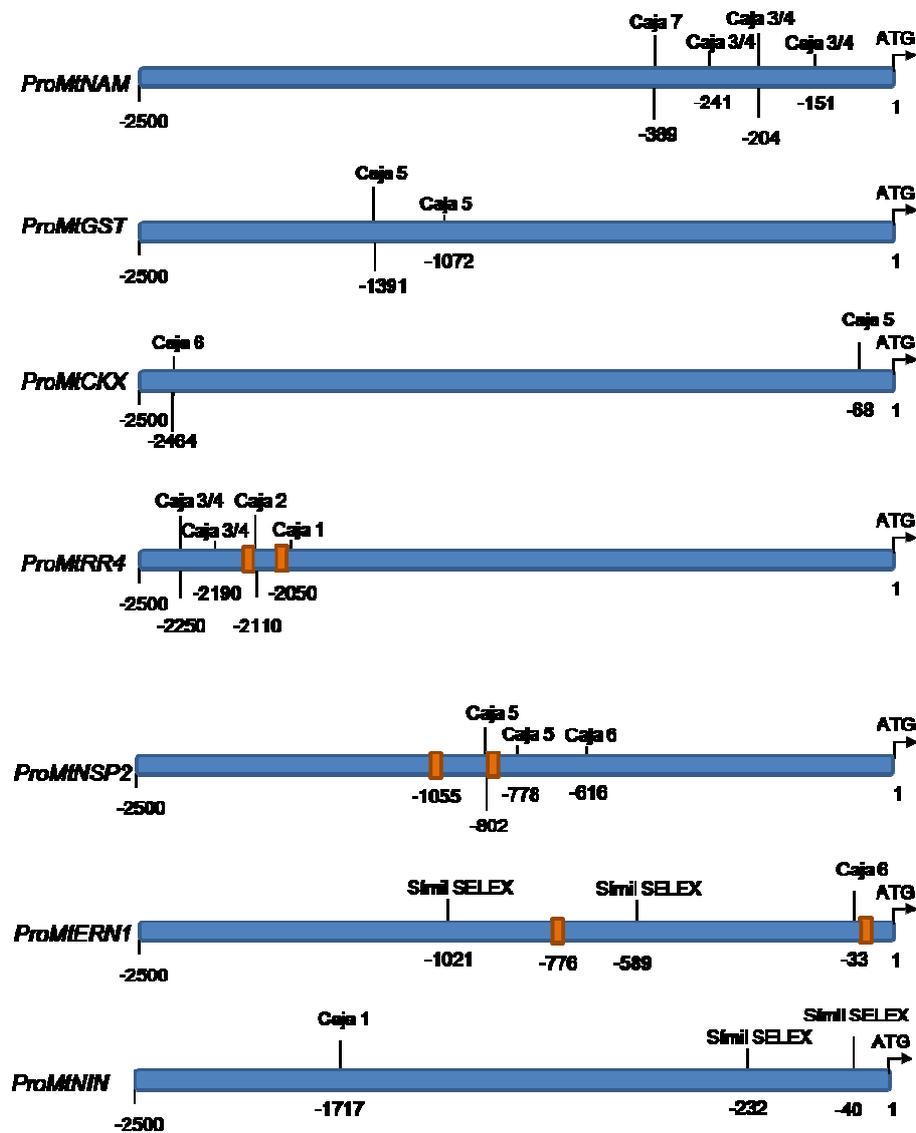


Figura 2.18. Esquema de los promotores de los genes de respuesta primaria *MtNAM*, *MtGST*, *MtCKX* y *MtRR4*, además de *MtNSP2*, *MtERN1* y *MtNIN*. Las Cajas de 8 pb identificadas bioinformáticamente están indicadas en el esquema, con la posición del primer nucleótido respecto del ATG. La indicación “Similar SELEX” se refiere a Cajas que coinciden al menos en 7 posiciones con el consenso del SELEX, pero diferentes a aquellas utilizadas para la búsqueda. La caja naranja en los promotores de *MtRR4*, *MtNSP2* y *MtERN1* indica la presencia de un elemento adicional conservado, descrito en la Figura 2.19.

Un estudio reciente hecho en *Lotus japonicus* mostró que las citoquininas pueden activar a *NIN* independientemente de *NSP2* (Maekawa y col., 2009). Estos datos junto con nuestros resultados nos permiten especular que la regulación de *ERN1* y *NIN* sea dependiente de los RRs de Tipo B. Vale la pena mencionar que dentro del *ProMtRR4* (Figura 2.19A), las Cajas 1 y 2 están ubicadas en una región repetida, y a su lado se encuentra una secuencia conservada también presente dos veces en los promotores de *MtNSP2* y de *MtERN1*, dispuestas en ciertos casos de manera adyacente a las Cajas 5 o 6, respectivamente (Figura 2.18 y 19B). Esta secuencia (5'-ATTTG(C/T)A(A/G)G-3') no fue encontrada en los promotores de los demás genes estudiados en este trabajo, ni tampoco coincide con los elementos *cis* descritos en plantas (referido a la base de datos PROSITE; <http://expasy.org/prosite/>). Tal arreglo de cajas conservadas en estos tres promotores alrededor de los elementos del tipo RR sugiere que otros FTs aún no identificados podrían interactuar con los RRs de Tipo B, tal vez en el contexto de la simbiosis.

A

```

MtRR4 Caja1 AGGGACCAAACCAAAACGAGACATATTTTGTAAGGACCAAAAAC
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
MtRR4 Caja2 AGGGACTAAAACCAAAATGAGACATATTTTGCAGGGACCAAAAAC
  
```

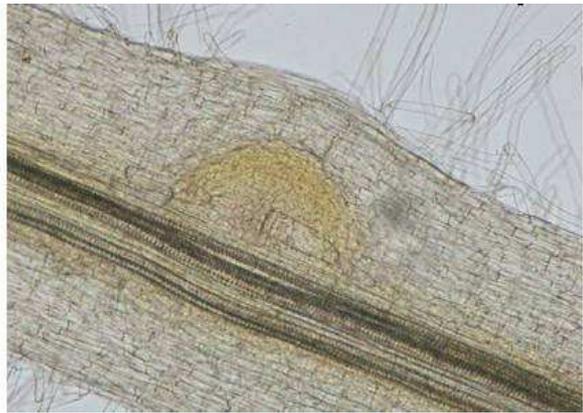
B

<i>MtNSP2</i> CAJA 5	GTTA	ATTTGCAAG	TAAATGAGATTAG	heb-
<i>MtNSP2</i> -1055	TATA	ATTTGCAAG	TCGTGAAGTATTC	heb-
<i>MtERN1</i> CAJA 6	TGTA	ATTTGCAAG	CTATGAGACTTTA	heb-
<i>MtERN1</i> -776	TTTT	ATTTGTAGG	GTTGCTGGTATTC	heb+
<i>MtRR4</i> CAJA 1	AACGAGACAT	ATTTGTAAG	GACC	heb-
<i>MtRR4</i> CAJA 2	AATGAGACAT	ATTTGCAGG	GACC	heb-
CONSENSO		TT	ATTTGCAAG	
	AA		T G	

Figura 2.19. Un elemento *cis* putativo asociado a las Cajas de los RRs de Tipo B está conservado en los promotores de los genes de nodulación *MtRR4*, *MtNSP2* y *MtERN1*. A) Alineamiento de las regiones que contienen las Cajas 1 y 2 (en rojo) en el *ProMtRR4*. B) Alineamiento del elemento conservado cerca de las Cajas reconocidas por RRs de Tipo B. A la izquierda se indica el nombre de la Caja más próxima (marcada en rojo) o la distancia al ATG en caso de que no haya otra Caja cercana. El recuadro amarillo encierra la región de mayor conservación. Las indicaciones “heb+/-” se refiere a si la secuencia mostrada se encuentra en la hebra positiva o la negativa.

En conclusión, este trabajo reveló la existencia de nuevos elementos *cis* reconocidos por RRs de Tipo B, permitiendo identificar genes de respuesta potencialmente primaria a citoquininas en las raíces de las leguminosas. Además, confirmamos la importancia de estos elementos *cis* en la regulación de la expresión de *MtRR4* y *MtNSP2* en respuesta a las citoquininas y durante la organogénesis de los nódulos simbióticos.

Conclusiones generales y perspectivas futuras



*“... I still haven't found
what I'm looking for...”*

(Bono • U2)

Conclusiones generales y perspectivas futuras

Al término de la primera década del siglo XXI, ya contamos con una descripción completa del genoma de las especies de leguminosas *Lotus japonicus*, *Glycine max* y una gran porción del de *Medicago truncatula*. El cúmulo de información creciente obtenida de estudios transcripcionales es de gran ayuda para identificar FTs potencialmente ligados a distintos procesos del desarrollo y la respuesta adaptativa al ambiente. En este trabajo de Tesis hemos abarcado el estudio de dos FTs involucrados en la señalización de las hormonas que determinan el sistema radicular en función del entorno.

El gen *MtHBI* codifica un FT de la familia HD-Zip, inducido a nivel transcripcional por ABA. Si bien *MtHBI* fue identificado por su respuesta al estrés salino (Gruber y col., 2009), es muy probable que este FT actúe en una respuesta general de la planta ante distintos tipos de estrés, gobernada por el ABA. A su vez, hemos demostrado su vinculación directa con un FT inducido por auxinas e involucrado en la determinación del sistema radicular. La acción de *MtHBI* ayuda a disminuir la superficie de la raíz en contacto con el medio estresante, regulando una vía de señalización de las auxinas. Nuestro trabajo ejemplifica un evento de la plasticidad del desarrollo en el que el ambiente inhibe la emergencia de las raíces laterales, interceptando las vías de señalización de las auxinas. Puntualmente, hemos detectado una vinculación molecular directa entre dos FTs en respuesta al estrés y al ABA. El avance en la descripción del genoma de *Medicago truncatula* permitirá confeccionar microarreglos de secuencias promotoras que puedan ser hibridizados con el producto de la inmunoprecipitación de la cromatina (técnica conocida como ChIP-chip). De esta manera, podríamos identificar la globalidad de los genes blanco regulados por *MtHBI*. Teniendo en cuenta la desorganización del meristema apical de las raíces en la mutante *mthb1* en respuesta a la sal, un ensayo de ChIP-chip ayudaría a dilucidar los mecanismos moleculares que estabilizan el ápice de la raíz ante el estrés.

Existen otros genes de la familia HD-Zip que han sido objetos de patentes biotecnológicas para el mejoramiento de cultivos en respuesta a estrés abiótico (Chan et al., 2007; Cabello et al., 2009). El comportamiento de las raíces de *M. truncatula* que sobre expresan *MtHBI* en respuesta al estrés salino, sugiere que este gen podría

utilizarse como una herramienta biotecnológica para la transformación estable de plantas leguminosas de interés agronómico, como ser la alfalfa o incluso la soja. Si bien los alcances de esta Tesis se han limitado a la caracterización de la arquitectura radicular, podría esperarse que una planta capaz de hacer crecer sus raíces en profundidad evadiendo el estrés salino, tuviera ventajas productivas con respecto a una planta salvaje. Es por eso que el estudio de la función de MtHB1 en las partes aéreas de *Medicago truncatula* queda pendiente.

Por otra parte, estudiamos el gen *MtRR1*, que codifica un FT de la familia RR de Tipo B. Hace pocos años se descubrió la conexión entre las hormonas citoquininas y el proceso de nodulación en *M. truncatula* y *L. japonicus*, mediante la caracterización respectiva de los receptores MtCRE1 y LHK (González-Rizzo y col., 2006; Murray y col., 2007). Desde ese entonces quedó planteada la pregunta de cuáles son los mecanismos moleculares que rigen este proceso de desarrollo. Sabiendo que los RRs de Tipo B son activados post-traduccionalmente por dichos receptores, nuestra estrategia persiguió como objetivo el identificar los potenciales genes que actúen como blancos de MtRR1, cuya transcripción está enriquecida durante la nodulación. Nuestro trabajo sirvió para trazar los primeros bosquejos de un mapa sumamente complejo. La multiplicidad de los elementos *cis* putativos en los promotores de los genes regulados por citoquininas, sumada a las secuencias conservadas adicionales en derredor, da una idea de la dimensión de estos complejos regulatorios. A su vez, la dificultad para determinar si la respuesta de los genes es de tipo primario mediante el uso de CHX, enturbia aún más el panorama. Sin embargo, hemos logrado identificar nuevos FTs potencialmente ligados al proceso de nodulación. Incluso, establecimos un vínculo entre los elementos *cis* reconocidos por MtRR1 *in vitro* y los promotores de genes clave en la organogénesis de los nódulos, como lo es *MtNSP2*. Nuestra investigación requerirá una profundización del estudio de cada una de las cajas presentes en el promotor de *NSP2*, para determinar su relevancia individual en la inducción del gen por citoquininas y durante la nodulación. Además, nuevas líneas de trabajo podrían empeñarse en dilucidar cuál RR de Tipo B reconoce específicamente cada variante de los elementos *cis*. Seguramente, se podrán llevar a cabo ensayos de simple híbrido para identificar que FTs reconocen, además, los núcleos adicionales conservados que se sitúan cerca de los

elementos similares al consenso del SELEX en los promotores de *MtRR4*, *MtNSP2* y *MtERN1* (Figuras 2.18 y 2.19).

Entre los genes regulados por citoquininas y que cuentan con más de un elemento *cis* putativo en su secuencia promotora, se encuentra uno de la familia LOB de FTs (Tabla 2.3 del Capítulo 2). El comportamiento de este gen en respuesta a las citoquininas resultó ambiguo, no sólo por la regulación ejercida por la CHX por sí sola, sino que además porque los resultados de la PCR cuantitativa no coinciden con aquellos obtenidos del ensayo de microarreglos. Más allá de eso, cabe mencionar que este gen (TC98397) es *MtLBD1*, blanco directo de MtHB1. Lo que parece ser una coincidencia extraordinaria, es sólo un ejemplo del llamativo número de genes regulados tanto por citoquininas como por el tratamiento por 1 h de NaCl 100 mM (Gruber y col., 2009). La combinación de ambos estudios transcripcionales permitirá en un futuro cercano seleccionar y caracterizar genes que pudieran tener un rol en el cruce de las vías de señalización del ambiente y de las hormonas citoquininas.

Probablemente, en los próximos años se obtendrán muchas respuestas acerca de los mecanismos que rigen la plasticidad del desarrollo del sistema radicular de las leguminosas. De lo que podemos estar seguros es que muchas preguntas nuevas e interesantes seguirán surgiendo constantemente.

Resumen • Summary



*“... te sentencio
a que nombres todo
lo que ahora no sé...”
(Silvio Rodríguez)*

Introducción

La plasticidad del desarrollo les permite a las plantas de un mismo genotipo dar lugar a fenotipos diferentes en función de las condiciones del entorno. Contrariamente a lo que sucede en los animales, las plantas exhiben una flexibilidad asombrosa en su arquitectura y el patrón de crecimiento en respuesta a los factores externos, gracias a la continua actividad de los meristemas apicales del tallo y de la raíz. A partir de ellos, se forman nuevos órganos una vez superada la embriogénesis. Las condiciones del entorno influyen sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, modulando los niveles y la señalización de las hormonas. La arquitectura de las raíces constituye un modelo adecuado para estudiar cómo la plasticidad del desarrollo responde a las condiciones de estrés. De hecho, el desarrollo de la raíz principal y la formación de meristemas *de novo* para dar lugar a las raíces laterales están condicionados por las características del suelo. Las hormonas juegan un papel fundamental en la formación de estos nuevos meristemas.

La familia de las leguminosas incluye a varios de los cultivos más importantes del mundo. Sus miembros pueden generar otros meristemas *de novo* en sus raíces, llamados nódulos, a partir de la interacción simbiótica con las bacterias del suelo. Los nódulos simbióticos les permiten a las plantas fijar nitrógeno atmosférico y crecer en suelos poco fértiles. Por este motivo, las leguminosas son consideradas como los cultivos pioneros para la incorporación de suelos salinos en la agricultura. Además, su presencia estimula el crecimiento de otras especies de plantas. Sin embargo, tanto el crecimiento como la arquitectura de las raíces, incluyendo la formación de los nódulos, son muy sensibles a las limitaciones del ambiente, como la disponibilidad de agua y el estrés salino, condiciones que se reflejan en el detrimento de la productividad.

Capítulo 1

La plasticidad del desarrollo de las raíces depende de la formación de las raíces laterales que emergen de la raíz principal. En la planta modelo de leguminosas *Medicago truncatula*, el factor de transcripción (FT) MtHB1 de la familia HD-Zip I se induce a nivel transcripcional por estrés salino y ABA. Con el fin de dilucidar el rol de MtHB1 en la formación de las raíces, se las transformó con *Agrobacterium rhizogenes*, obteniendo así plantas quiméricas con una parte aérea salvaje y raíces transgénicas. El

análisis de la actividad de su región promotora dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* demostró que *MtHBI* se transcribe en los meristemas de la raíz principal y de las raíces laterales. La expresión constitutiva de *MtHBI* en las raíces de *M. truncatula* altera su arquitectura, disminuyendo la densidad de las raíces laterales emergentes. A su vez, las plantas mutantes TILLING *mthb1* sufren un incremento en el porcentaje de emergencia de sus raíces laterales, aunque la iniciación de las mismas no se ve alterada. Mediante ensayos de retardo en geles, mutagénesis dirigida de las secuencias promotoras e inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR, se determinó que *MtHBI* reconoce en forma directa la secuencia CAATAATTG presente en el promotor del gen de tipo LOB (del inglés, LATERAL ORGAN BOUNARIES) *MtLBD1*. Este gen está regulado a nivel transcripcional por las auxinas. La expresión de ambos genes (*MtHBI* y *MtLBD1*) en respuesta a ABA y auxinas y sus comportamientos en las plantas *mthb1* indicaron que existe una represión directa de *MtLBD1* por parte de *MtHBI* durante la emergencia de las raíces laterales. *MtHBI* regula una respuesta adaptativa del desarrollo de *M. truncatula* con el fin de minimizar la superficie de contacto de las raíces con el medio estresante.

Capítulo 2

Las fitohormonas citoquininas controlan diversos procesos del desarrollo. El receptor *MtCRE1* (del inglés, CYTOKININ RESPONSE 1) es crucial para la interacción simbiótica de las leguminosas con las bacterias fijadoras de nitrógeno. Los receptores de citoquininas activan un sistema de fosforilación que regula post-traduccionamente a los FTs de la familia de los Response Regulators (RRs) de Tipo B, y la expresión de genes de respuesta primaria. En nuestro trabajo hemos identificado genes inducidos por las citoquininas en las raíces de *M. truncatula*, a partir de un ensayo de microarreglos. Por otro lado, hemos determinado una secuencia consenso de 12 pb reconocida *in vitro* por el FT *MtRR1*, llevando a cabo una estrategia de SELEX. Entre los genes de respuesta primaria a las citoquininas, resultó interesante que *MtRR4* presentaba varias Cajas del tipo RR en su región promotora. Pudimos demostrar mediante ensayos de mutagénesis y ensayos de retardo en geles con extractos nucleares de raíces tratadas con BAP que estos elementos *cis* son indispensables para una respuesta normal a las citoquininas *in planta*.

El análisis transcripcional de la respuesta a corto plazo de las raíces de *M. truncatula* al tratamiento con citoquininas exógenas permitió identificar genes homólogos a aquellos descritos en *Arabidopsis* como regulados por estas hormonas. Además, pudimos identificar otros genes no caracterizados, en cuyos promotores existen secuencias relacionadas a las Cajas del tipo RR. Varios de estos transcritos correspondientes son regulados por citoquininas de manera independiente a la formación de proteínas *de novo*, o resultaron ser dependientes de la vía de señalización de MtCRE1. Entre los nuevos genes probablemente regulados por los RRs de Tipo B identificamos a *MtNSP2*, que codifica un FT involucrado en las etapas tempranas de la nodulación. Pudimos demostrar que la región de su promotor que contiene las Cajas de tipo RR es esencial para la activación por citoquininas y la expresión de *MtNSP2* durante la nodulación. Proponemos entonces que la activación del sistema de fosforilación a través de los RRs de Tipo B es necesaria para la regulación de *MtNSP2* por las citoquininas durante la organogénesis de los nódulos simbióticos.

Introduction

Developmental plasticity allows higher plants having the same genotype to give rise to different phenotypes depending on environmental conditions. In contrast with animals, plants exhibit a remarkable flexibility in their architecture and growth patterns in response to external conditions, due to the continuously active shoot and root meristems and their capability to generate new organs after embryogenesis. External cues influence plant growth by modulating hormone levels and signaling. The root architecture of the plant constitutes an important model to study how developmental plasticity is translated into growth responses under stress conditions. Indeed, primary root development and the formation of *de novo* meristems to generate lateral roots (LRs) are conditioned by the soil environment. Plant hormones have been shown to play primary roles in the generation of the new meristems.

Legumes, one of the major crops worldwide, can also generate on their roots other *de novo* meristems, so-called root nodules, through symbiotic interactions with soil bacteria. These organs allow legumes to fix atmospheric nitrogen and to grow in nitrogen-poor soils. Hence, legumes are considered interesting pioneer crops for the incorporation of salty soils into agriculture as their presence may allow growth of other plant species. However, their root growth and architecture, including nodule formation, are still highly sensitive to environmental constraints, such as water availability and salt stress, resulting in a restricted productivity.

Chapter 1

Root developmental plasticity depends on the formation of LRs emerging from primary roots. In the model legume *Medicago truncatula*, the HD-Zip I transcription factor MtHB1 is expressed in primary and lateral root meristems and induced by salt stress. Constitutive expression of *MtHB1* in *M. truncatula* roots alters their architecture, whereas *mthb1* TILLING mutants showed increased LR emergence. Electrophoretic mobility shift assay, promoter mutagenesis, and chromatin immunoprecipitation–PCR assays revealed that MtHB1 directly recognizes a CAATAATTG *cis*-element present in the promoter of a LOB-like (for LATERAL ORGAN BOUNDARIES) gene, *MtLBD1*, transcriptionally regulated by auxin. Expression of these genes in response to ABA and auxin and their behavior in *mthb1* mutants revealed an MtHB1-mediated repression of

MtLBD1 acting during LR emergence. *M. truncatula MtHB1* regulates an adaptive developmental response to minimize the root surface exposed to adverse environmental stresses.

Chapter 2

Cytokinins control many aspects of plant development and the MtCRE1 (CYTOKININ RESPONSE 1) receptor is crucial for the symbiotic interaction in legumes. The cytokinin phosphorelay signaling activated downstream of cytokinin receptors leads to the activation of Type-B Response Regulator (RR) transcription factors (TFs) and the expression of primary response genes. We identified cytokinin transcriptional targets in legume roots by characterizing a 12 bp consensus sequence bound *in vitro* by the *Medicago truncatula* MtRR1 TF, the so-called RR Binding Site (RRBS). Several related *cis*-elements are found in the *MtRR4* cytokinin primary response gene and required for its cytokinin responsiveness *in planta*. A transcriptomic approach of root short-term responses to cytokinins revealed not only homologs of cytokinin primary response genes described in *Arabidopsis* but also new genes containing related RRBS *cis*-elements in their promoters. Several of these transcripts showed a cytokinin regulation independently of *de novo* protein synthesis or were dependent on the MtCRE1 pathway. Among the different new putative direct RR targets, we identified the MtNSP2 TF involved in the early stages of the legume-specific root nodulation. RRBS present in this promoter are essential for cytokinin and early symbiotic regulation of *MtNSP2* expression. Thus, direct phosphorelay activation through specific RRs that remain to be identified is likely required for cytokinin regulation of this critical nodulation signaling gene.

Referencias



*“... porque vivir es jugar
y yo quiero seguir jugando...”
(Andrés Calamaro)*

Referencias

- Abascal, F., Zardoya, R. y Posada, D.** (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**, 2104-2105.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. y Harberd, N.** (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91-94.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G. y Genschik, P.** (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **19**, 1188-1193.
- Alabadi, D., Blazquez, M., Carbonell, J., Ferryiz, F. y Perez-Amador, M.** (2009). Instructive roles for hormones in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1597-1608.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. y Ullrich, C.** (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* **97**, 883-893.
- Apse, M., Aharon, G., Snedden, W. y Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 1256-1258.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K.** (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S., Muday, G., Asami, T. y Yang, Z.** (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 1624-1631.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. y Scheible, W.** (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* **141**, 988-999.
- Ben Amor, B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., Maizel, A., Mallory, A., Lucas, A., Deragon, J., Vaucheret, H., Thermes, C. y Crespi, M.** (2009). Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Res.* **19**, 57-69.
- Benfey, P.** (2005). Developmental Networks. *Plant Physiol.* **138**, 548-549.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Stat. Soc.* **B57**, 289-300.

- Benkova, E., Ivanchenko, M., Friml, J., Shishkova, S. y Dubrovsky, J.** (2009). A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Sci* **14**, 189-193.
- Bimboim, H. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bishopp, A., Mahonen, A.P. y Helariutta Y.** (2006). Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**, 1857-1869.
- Blackwell, T. y Weintraub, H.** (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* **250**, 1104-1110.
- Blondon, F.** (1964). Contribution à l'étude du développement de graminées forragères: Ray-grass et dactyle. *Rev. Gen. Bot.* **71**, 293-381.
- Boerjan, W., Cervera, M., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Onckelen, H., Montagu, M. y Inze, D.** (1995). *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405-1419.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. y Barker, D.** (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.
- Brady, S., Sarkar, S., Bonetta, D. y McCourt, P.** (2003). The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 67-75.
- Brady, S., Orlyo, D., Lee, J., Wang, J., Koch, J., Dinneny, J., Mace, D., Ohler, U. y Benfey, P.** (2007). A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science* **318**, 801-806.
- Brystatter, I. y Kieber, J.** (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1009-19.
- Brenner, W., Romanov, G., Kollmer, I., Burkle, L. y Schmulling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* **44**, 314-33.

- Bright, L., Liang, Y., Mitchell, D. y Harris, J.** (2005). The *LATD* gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 521-532.
- Brown, N., Leroy, C. y Syer, C.** (1998). MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics* **14**, 380-381.
- Brundrett, M.** (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **79**, 473-495.
- Cabello, J., Arce, A. y Chan, R.** (2009). Patent Application Number: 09093188.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. y Ruberti, I.** (2007). Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes & Dev.* **21**, 1863-1868.
- Cannon, S., May, G. y Jackson, S.** (2009). Three sequenced legume genomes and many crop species: rich opportunities for translational genomics. *Plant Physiol.* **151**, 970-977.
- Carvalho, H., Lopes-Cardoso, I., Lima, L., Melo, P. y Cullimore, J.** (2003). Nodule-specific modulation of glutamine synthetase in transgenic *Medicago truncatula* leads to inverse alterations in asparagine synthetase expression. *Plant Physiol.* **133**, 243-252.
- Carrere, S. y Gouzy, J.** (2006). REMORA: a pilot in the ocean of BioMoby web-services. *Bioinformatics* **22**, 900-901.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Syberg, G., Casero, P. y Bennett, M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. y Denarie, J.** (2000). Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1666.
- Celenza, J., Grisafi, P. y Fink, G.** (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Dev.* **9**, 2131-2142.
- Chan, R., Gago, G., Palena, C. y Gonzalez, D.** (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochim Biophys Acta* **1442**, 1-19.
- Chan, R., Gonzalez, D., Dezar, C., Gago, G., Dunan, C.** (2007). Patent Number: US20070180584

- Chen, C., Yang, Y., Lur, H., Tsai, Y. y Chang, M.** (2006). A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa L.*) root growth and development. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1-13.
- Cheng, W., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T. y Sheen, J.** (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**, 2723-2743.
- Chiou, T., Aung, K., Lin, S., Wu, C., Chiang, S. y Su, C.** (2006). Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 412-421.
- Choi, H., Mun, J., Kim, D., Zhu, H., Baek, J., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G., Young, N. y Cook, D.** (2004). Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**, 15289-15294.
- Cluis, C., Mouchel, C. y Hardtke, C.** (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J.* **38**, 332-347.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. y Lamattina, L.** (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.
- Crespi, M. y Frugier, F.** (2008). De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* **1**, re11-.
- Crooks, G., Hon, G., Chyonia, J. y Brenner, S.** (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188-1190.
- D'Agostino, I., Deruere, J. y Kieber, J.** (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* **124**, 1706- 17.
- De Billy, F., Grosjean, C., May, S., Bennett, M. y Cullimore, J.** (2001). Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 267-277.
- De Smet, I., Signora, L., Beekman, T., Inze, D., Foyer, C. y Zhang, H.** (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 543-555.
- De Smet, I., Vanneste, S., Inze, D. y Beekman, T.** (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* **60**, 871-887.

- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D. y Beeckman, T.** (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* **11**, 434-439.
- Deak, K. y Malamy, J.** (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J.* **43**, 17-28.
- Dello Ioio, R., Linhares, F., Scacchi, E., Casamitjana-Martí, E., Heidstra, R., Costantino, P. y Sabatini, S.** (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* **17**, 678-682.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M., Aoyama, T., Costantino, P. y Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380-1384.
- Dezar, C., Fedrigo, G. y Chan, R.** (2005) The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Sci* **169**, 447-459.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J., Harris, J. y Oldroyd, G.** (2008). Abscisic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**, 2681-2695.
- Dinneny, J., Long, T., Wang, J., Jung, J., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S., Schiefelbein, J. y Benfey, P.** (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* **320**, 942-945.
- Dolan, L.** (1996). Pattern in the root epidermis: an interplay of diffusible signals and cellular geometry. *Ann. Bot.* **77**, 547-553.
- Doyle, J.** (1998). Molecules, morphology, fossils, and the relationship of angiosperms and Gnetales. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**, 448-462.
- Doyle, J. y Luckow, M.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* **131**, 900-910.
- Drew, M. y Saker, L.** (1975). Nutrient supply and the growth of the seminal root system in Barley. *J. Exp. Bot.* **26**, 79-90.
- Dubrovsky, J., Rost, T., Colon-Carmona, A. y Doerner, P.** (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**, 30-36.

- Dugardeyn, J., Vyembussche, F. y Van Der Straeten, D.** (2008). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *J. Exp. Bot.* **59**, 1-16.
- Fitter, A.** (1986). The topology and geometry of plant root systems: influence of watering rate on root system topology in *Trifolium pratense*. *Ann. Bot.* **58**, 91-101.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J., Crespi, M. y Szczyglowski, K.** (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci.* **13**, 115-120.
- Fu, X. y Harberd, N.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740-743.
- Fujii, H., Chiou, T., Lin, S., Aung, K. y Zhu, J.** (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **15**, 2038-2043.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. y Tasaka, M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J.* **29**, 153-168.
- Fukaki, H. y Tasaka, M.** (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* **69**, 437-449.
- Gage, D.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280-300.
- Garber, R., Kuroiwa, A. y Gehring, W.** (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila. *EMBO J.* **2**, 2027-2036.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. y Scheres, B.** (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**, 1053-1057.
- Georgin, P. y Gouet, M.** (2000). *Statistiques avec Excell.* (Paris: Eyrolles).
- Glass, A., Britto, D., Kaiser, B., Kinghorn, J., Kronzucker, H., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M., Unkles, S. y Vidmar, J.** (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 855-864.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S. y Yoshida, S.** (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**, 1319-1334.

- Gonzalez, D., Valle, E. y Chan, R.** (1997). Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochim. Biophys. Acta* **1351**, 137-149.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. y 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.
- Goormachtig, S., Capoen, W. y Holsters, M.** (2004). Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends Plant Sci.* **9**, 518-522.
- Graham, P. y Vance, C.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**, 872-877.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., Eshed, Y. y Weiss, D.** (2005) Cross-talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* **17**, 92 - 102.
- Gruber, V., Blanchet, S., Diet, A., Zahaf, O., Boualem, A., Kakar, K., Alunni, B., Udvardi, M., Frugier, F. y Crespi, M.** (2009). Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in *Medicago truncatula*. *Mol. Genet. Genomics* **281**, 55-66.
- Haeckel, E.** (1868). *Generelle Morphologie der Organismen: allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von C. Darwin reformirte Decendenz-Theorie.* Berlin.
- Hardtke, C.** (2006). Root development - branching into novel spheres. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 66-71.
- Harrison, M.** (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 19-42.
- Heckmann, A., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T. y Downie, J.** (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* **142**, 1739-1750.
- Henckel, K., Runte, K., Bekel, T., Dondrup, M., Jakobi, T., Kuster, H. y Goesmann, A.** (2009) TRUNCATULIX - a data warehouse for the legume community. *BMC Plant Biol.* **9**, 19.

- Henriksson, E., Olsson, A., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engstrom, P. y Soderman, E.** (2005). Homeodomain Leucine Zipper Class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* **139**, 509-518.
- Hetrick, B., Wilson, G. y Figge, D.** (1994). The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. *Environ. Pollut.* **86**, 171-179.
- Heyl, A. y Schmulling, T.** (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **6**, 480-488.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. y Sakakibara, H.** (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75-83.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A., Downie, A. y Oldroyd, G.** (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545-557.
- Hobbie, L. y Estelle, M.** (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* **7**, 211-220.
- Hochholdinger, F. y Zimmermann, R.** (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 70-74.
- Hofer, J., Turner, L., Moreau, C., Ambrose, M., Isaac, P., Butcher, S., Weller, J., Dupin, A., Dalmais, M., Le Signor, C., Bendahmane, A. y Ellis, N.** (2009). *Tendrill-less* regulates tendrill formation in pea leaves. *Plant Cell* **21**, 420-428.
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T. y Yamazaki, T.** (2002). Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**, 2015-29.
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M., Gaasterly, T., Tingey, S. y Chua, N.** (2003). Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **554**, 373-80.
- Huang, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E., James, R., Platten, J., Dennis, E. y Munns, R.** (2006). A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for Nax1, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiol.* **142**, 1718-1727.

- Huelsbeck, J., Ronquist, F., Nielsen, R. y Bollback, J.** (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* **294**, 2310-2314.
- Hunter, C. y Poethig, R.** (2004). ReFUSing to grow up. *Dev. Cell* **7**, 288-289.
- Husbys, A., Bell, E., Shuai, B., Smith, H. y Springer, P.** (2007). LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6663-6671.
- Hwang, I. y Sheen, J.** (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-9.
- Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T. y Mizuno, T.** (2003). *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 122-131.
- Ivanchenko, M., Coffeen, W., Lomax, T. y Dubrovsky, J.** (2006). Mutations in the *Diageotropica (Dgt)* gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.* **46**, 436-447.
- Jefferson, R., Kavanagh, T. y Bevan, M.** (1987). Gus Fusions - Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher-Plants. *Embo J.* **6**, 3901-3907.
- Kaelin, W., Krek, W., Sellers, W., DeCaprio, J., Ajchenbaum, F., Fuchs, C., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. y Blanas, M.** (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**, 351-364.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S., Rogers, J., Kiss, G., Downie, J. y Oldroyd, G.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y. y Tabata, S.** (2003). Structural Analysis of a *Lotus japonicus* Genome. III. Sequence Features and Mapping of Sixty-two TAC Clones Which Cover the 6.7 Mb Regions of the Genome. *DNA Res.* **10**, 27-33.
- Kant, I.** (1755). Allgemeine Naturgeschichte und Theorie des Himmels. (Publicación anónima).
- Karimi, M., Inze, D. y Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193-195.

- Katoh, K. y Toh, H.** (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* **9**, 286-298.
- Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H. y Mizuno, T.** (2004). Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1063-1077.
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H. y Mizuno, T.** (2005). Combinatorial microarray analysis revealing Arabidopsis genes implicated in cytokinin responses through the His-Asp phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiol.* **46**, 339-355.
- Kim, H., Kwon, M., Ryu, H., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., An, C., Lee, I., Hwang, I. y Choe, S.** (2006). The regulation of DWARF4 expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **140**, 548-557.
- King, J., Stimart, D., Fisher, R. y Bleecker, A.** (1995). A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**, 2023-2037.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. y Kyojuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kutschera, U. y Niklas, K.** (2009). Evolutionary plant physiology: Charles Darwin's forgotten synthesis. *Naturwissenschaften* **96**, 1339-1354.
- Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lyschulz, W., Johnson, P. y McKnight, S.** (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Laskowski, M., Williams, M., Nusbaum, H. y Sussex, I.** (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**, 3303-3310.
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T. y Prusty, R.** (2006). Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.* **47**, 788-792.
- Le Signor, C., Savoie, V., Aubert, G., Verdier, J., Nicolas, M., Pagny, G., Moussy, F., Sanchez, M., Baker, D., Clarke, J. y Thompson, R.** (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 430-441.

- Lee, Y. y Chun, J.** (1998). A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* **37**, 377-384.
- Lee, H., Kim, N., Lee, D. y Kim, J.** (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**, 1377-1389.
- Lelyais-Briere, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Gouzy, J. y Crespi, M.** (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell* **21**, 2780-2796.
- Liang, Y. y Harris, J.** (2005). Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and non-legumes. *Am. J. Bot.* **92**, 1675-1683.
- Liang, Y., Mitchell, D. y Harris, J.** (2007). Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula latd* mutant. *Dev. Biol.* **304**, 297-307.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H. y Wu, P.** (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J.* **43**, 47-56.
- Linkohr, B., Williamson, L., Fitter, A. y Leyser, H.** (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**, 751-760.
- Little, D., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. y Malamy, J.** (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 13693-13698.
- Lloret, P., Vidal, M., Casero, P. y Navascues, J.** (1985). The relationship between lateral-root distribution and endodermis and pericycle cell length in *Allium cepa* L. adventitious roots. *Ann. Bot.* **56**, 189-195.
- Lohar, D., Schaff, J., Laskey, J., Kieber, J., Bilyeu, K. y Bird, D.** (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J.* **38**, 203-214.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., Kudla, J. y Harter, K.** (2001). The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the

- expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 2-13.
- Lopez-Bucio, J., Hernyez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M., Simpson, J. y Herrera-Estrella, L.** (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**, 244-256.
- Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A. y Herrera-Estrella, L.** (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 280-287.
- Lynch, J.** (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* **109**, 7-13.
- Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y. y Hayashi, M.** (2009) Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J.* **58**, 183-194.
- Malamy, J. y Benfey, P.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Malamy, J. y Ryan, K.** (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 899-909.
- Maliga P., Klessig D., Cashmore A., Gruissem W. y Varner J.** (1995). Identification of promoter sequences that interact with DNA binding proteins. *Methods in plant molecular biology: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 233–260.
- Manavella, P., Arce, A., Dezar, C., Bitton, F., Renou, J., Crespi, M. y Chan, R.** (2006). Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Plant J.* **48**, 125-137.
- Manavella, P., Dezar, C., Ariel, F., Drincovich, M. y Chan, R.** (2008a). The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes. *J. Exp. Bot.* **59**, 3143-3155.
- Manavella, P., Dezar, C., Ariel, F. y Chan, R.** (2008b). Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 860-867.
- Marisa, L., Ichanté, J.L., Reymond, N., Aggerbeck, L., Delacroix, H. y Mucchielli-Giorgi, M.** (2007) MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis. *Bioinformatics* **23**, 2339-2341.

- Marx, C. y Engels, F.** (1974) Obras escogidas, en tres tomos, Editorial Progreso, Moscú, tomo 3.
- Mauch-Mani, B. y Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 409-414.
- Mendel G.** (1865). Verhandlungen des Naturforschenden Vereines. Brno **4**, 3-47.
- Merchan, F., de Lorenzo, L., Rizzo, S., Niebel, A., Manyani, H., Frugier, F., Sousa, C. y Crespi, M.** (2007). Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **51**, 1-17.
- Middleton, P., Jakab, J., Penmetsa, R., Starker, C., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J., Mitra, R., Kereszt, A., Dudas, B., VyenBosch, K., Long, S., Cook, D., Kiss, G. y Oldroyd, G.** (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Montiel, G., Gantet, P., Jay-Allemy, C. y Breton, C.** (2004). Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* **136**, 3478-3485.
- Moog, P., Van der Kooij, T., Bruggemann, W., Schiefelbein, J. y Kuiper, P.** (1995). Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the Turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* **195**, 505-513.
- Moreau, D., Salon, C. y Munier-Jolain, N.** (2006). Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant Cell Environ.* **29**, 1087-1098.
- Mouchel, C., Osmont, K. y Hardtke, C.** (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* **443**, 458-461.
- Muller, B. y Sheen, J.** (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094-1097.
- Murakami, Y., Miwa, H., Imaizumi-Anraku, H., Kouchi, H., Downie, J., Kawaguchi, M. y Kawasaki, S.** (2006). Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Res.* **13**, 255-265.

- Murray, J., Karas, B., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. y Szczyglowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Mussig, C., Shin, G. y Altmann, T.** (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 1261-1271.
- Nemhauser, J. y Chory, J.** (2004). BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *J. Exp. Bot.* **55**, 265-270.
- Oka-Kira, E. y Kawaguchi, M.** (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 496-502.
- Okushima, Y., Overvoorde, P., Arima, K., Alonso, J., Chan, A., Chang, C., Ecker, J., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. y Theologis, A.** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**, 444-463.
- Oldroyd, G. y Geurts, R.** (2001). *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before. *Trends Plant Sci.* **6**, 552-554.
- Oldroyd, G. y Downie, J.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 519-546.
- Oliphant A., Bryl C. y Struhl K.** (1989) Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. *Mol. Cell Biol.* **9**, 2944-2949.
- Olsson, A., Engstrom, P. y Soderman, E.** (2004). The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **55**, 663-677.
- Osmont, K., Sibout, R. y Hardtke, C.** (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 93-113.
- Pajuelo, E. y Stougaard, J.** (2005). *Lotus japonicus* as a model system. *Lotus japonicus Handbook*. Marquez, A. Springer: 3-24
- Palena, C., Gonzalez, D., Guelman, S. y Chan, R.** (1998). Expression of sunflower homeodomain containing proteins in *Escherichia coli*: purification and functional studies. *Protein Expr. Purif.* **13**, 97-103.
- Penmetsa, R., Frugoli, J., Smith, L., Long, S. y Cook, D.** (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**, 998-1008.

- Penmetsa, R., Uribe, P., Yerson, J., Lichtenzveig, J., Gish, J., Nam, Y., Engstrom, E., Xu, K., Sckisel, G., Pereira, M., Baek, J., Lopez-Meyer, M., Long, S., Harrison, M., Singh, K., Kiss, G., Cook, D.** (2008). The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, *sickle*, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant J.* **55**, 580-595.
- Panter, S., Thomson, R., De Bruxelles, G., Laver, D., Trevaskis, B. y Udvardi, M.** (2000). Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 325-333.
- Peret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T. y Bennett, M.** (2009a). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* **14**, 399-408.
- Peret, B., Larrieu, A. y Bennett, M.** (2009b). Lateral root emergence: a difficult birth. *J. Exp. Bot.* **60**, 3637-3643.
- Perez-Torres, C., Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M. y Herrera-Estrella, L.** (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* **20**, 3258-3272.
- Pichon, M., Journet, E., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. y Barker, D.** (1992). *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* **4**, 1199-1211.
- Ponce, G., Barlow, P., Feldman, L. y Cassab, G.** (2005). Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant Cell Environ.* **28**, 719-732.
- Price, A., Atherton, N. y Hendry, G.** (1989). Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Radic. Res. Commun.* **8**, 61-66.
- Quyt, H., Puhler, A. y Broer, I.** 1993. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 699-706.
- Rashotte, A., Carson, S., To, J. y Kieber, J.** (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1998-2011.

- Rashotte, A., Mason, M., Hutchison, C., Ferreira, F., Schaller, G. y Kieber, J.** (2006). A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **103**, 11081-11085.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A. y Murray, J.** (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K. y Scheible, W.** (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3567-3584.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A., Iglesias, J., Leyva, A. y Paz-Ares, J.** (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Dev.* **15**, 2122-2133.
- Ruzicka, K., Simásková, M., Duclercq, J., Petrásek, J., Zazimalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. y Benková, E.** (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 4284 - 4289.
- Sakai, H., Aoyama, T. y Oka, A.** (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* **24**, 703-711.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. y Oka, A.** (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**, 1519-1521.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. y Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-195.
- Schena, M. y Davis, R.** (1992). HD-Zip Proteins: Members of an Arabidopsis Homeodomain Protein Superfamily. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 3894-3898.
- Schmidt, H., Strimmer, K., Vingron, M. y Von Haeseler, A.** (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**, 502-504.
- Schwechheimer, C., Serino, G. y Deng, X.** (2002). Multiple Ubiquitin Ligase-Mediated Processes Require COP9 Signalosome and AXR1 Function. *Plant Cell* **14**, 2553-2563.

- Sedmak J. y Grossberg S.** (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal Biochem.* **79**, 544-552.
- Sessa, G., Morelli, G. y Ruberti, I.** (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* **12**, 3507-3517.
- Shetty, K., Hetrick, B., Figge, D. y Schwab, A.** (1994). Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environ. Pollut* **86**, 181-188.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Seki, M.** (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 410-417.
- Shuai, B., Reynaga-Pena, C. y Springer, P.** (2002). The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* **129**, 747-761.
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C. y Zhang, H.** (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J.* **6**, 655-62.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T. y Geurts, R.** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**, 1789-1791.
- Smit, P. y Bisseling, T.** (2008). *Genetics: A way to unravel molecular mechanisms controlling the Rhizobial-legume symbiosis* (Springer).
- Smith, D. y Johnson, K.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathione S-Transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Soderman, E., Mattsson, J., Svenson, M., Borkird, C. y Engstrom, P.** (1994). Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **26**, 145-154.
- Soderman, E., Mattsson, J. y Engstrom, P.** (1996). The *Arabidopsis* homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* **10**, 375-381.
- Soltis, D., Soltis, P., Morgan, D., Swensen, S., Mullin, B., Dowd, J. y Martin, P.** (1995). Chloroplast Gene Sequence Data Suggest a Single Origin of the Predisposition for Symbiotic Nitrogen Fixation in Angiosperms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 2647-2651.

- Sorin, C., Bussell, J., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Syberg, G. y Bellini, C.** (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell* **17**, 1343-1359.
- Steffens, B., Wang, J. y Sauter, M.** (2006). Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta* **223**, 604-612.
- Stepanova, A., Hoyt, J., Hamilton, A. y Alonso, J.** (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 2230-2242.
- Stepanova, A., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L., Xie, D., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G. y Alonso, J.** (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177-191.
- Stracke, R., Werber, M. y Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-456.
- Subramanian, S., Stacey, G. y Yu, O.** (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.* **12**, 282-285.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. y Bennett, M.** (2002). Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Mol. Biol.* **49**, 411-426.
- Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J., Taylor, C., Schachtman, D., May, S., Syberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L. y Bennett, M.** (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* **10**, 946-954.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M., Harper, R., Liscum, E. y Yamamoto, K.** (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 379-393.

- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L., Rhee, S. y Stitt, M.** (2004). Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**, 914-939.
- Thome, O.** (1885) Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Gera, Alemania
- Tirichine, L., Syal, N., Madsen, L., Radutoiu, S., Albrechtsen, A., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. y Stougaard, J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**, 104-107.
- Tron, A., Welchen, E. y Gonzalez, D.** (2004). Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site. *Biochem.* **43**, 15845-15851.
- Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A., Rosenberg, C., Batut, J., Maillet, F. y Denarie, J.** (1985). Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.* **164**, 1200-1210.
- Turner, F. y Mahowald, A.** (1979). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. III. Formation of the head and caudal segments. *Dev. Biol.* **68**, 96-109.
- Ubeda-Tomas, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G., Hedden, P., Bhalerao, R. y Bennett, M.** (2008). Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signaling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 625-628.
- Ubeda-Tomas, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. y Bennett, M.** (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr. Biol.* **19**, 1194-1199.
- Udvardi, M., Tabata, S., Parniske, M. y Stougaard, J.** (2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* **10**, 222-228.
- Udvardi, M., Kakar, K., Wyrey, M., Montanari, O., Murray, J., Yriankaja, A., Zhang, J., Benedito, V., Hofer, J., Chueng, F. y Town, C.** (2007). Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol.* **144**, 538-549.

- Vyesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34.1-34.11.
- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S. y Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**, 4295-4306.
- Verslues, P. y Zhu, J.** (2005). Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem Soc. Trans.* **33**, 375-379.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. y Hake, S.** (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**, 241-243.
- Walch-Liu, P., Liu, L.-H., Remans, T., Tester, M. y Forde, B.** (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1045-1057.
- Wang, H. y Grusak, M.** (2005). Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. *Ann. Bot.* **95**, 737-747.
- Welchen, E. y Gonzalez, D.** (2005) Differential expression of the *Arabidopsis* cytochrome *c* genes *Cytc -1* and *Cytc -2*: evidence for the involvement of TCP-domain protein binding elements in anther and meristem-specific expression of the *Cytc -1* gene. *Plant Physiol.* **139**, 88-100.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. y Schmulling, T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner, T. y Schmulling, T.** (2009). Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- Williamson, L., Ribrioux, S., Fitter, A. y Leyser, H.** (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 875-882.
- Wolff, K.** (1759) *Theoria generationis* (Disertación).
- Wolters, H. y Jurgens, G.** (2009). Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 305-317.

- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F., Jiang, Q., Gresshoff, P., De Bruijn, F., Stougaard, J. y Szczyglowski, K.** (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* **23**, 97-114.
- Xiong, L., Wang, R., Mao, G. y Koczan, J.** (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* **142**, 1065–1074.
- Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D., Peng, V., Ngai, J. y Speed, T.** (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**, e15.
- Yendrek, C., Lee, Y., Morris, V., Liang, Y., Pislariu, I., Burkart, G., Meckfessel, H., Salehin, M., Kessler, H., Wessler, H., Lloyd, M., Lutton, H., Teillet, A., Sherrier, D., Journet, E., Harris, M. y Dickstein, R.** (2010) A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **62**, 100-112.
- Yokota, T., Sato, T., Takeuchi, Y., Nomura, T., Uno, K., Watanabe, T. y Takatsuto, S.** (2001). Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-norcastasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone. *Phytochem.* **58**, 233-238.
- Zhang, H. y Forde, B.** (1998). An Arabidopsis MADS box gene that Controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407-409.
- Zhu, J.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247-273.
- Zolobowska, L. y Van Gijsegem, F.** (2006). Induction of lateral root structure formation on petunia roots: A novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in Hrp mutants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 597-606.