
Análisis funcional del factor de transcripción ERF10 en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

Memoria presentada por

MARÍA EUGENIA CAVERO ASIAIN

para obtener el Master en Agrobiología Ambiental

Directora: **ESTÍBALIZ LARRAINZAR RODRÍGUEZ**

PAMPLONA

SEPTIEMBRE 2017

Resumen

Las leguminosas constituyen uno de los taxones agrícolas más importantes del mundo debido a la capacidad de establecer relaciones simbióticas con bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium*. Estas plantas proporcionan una importante fuente de proteínas para los seres humanos y los animales, y además producen más de 100 millones de toneladas de nitrógeno fijado anualmente y son una parte vital del ciclo del nitrógeno global. Asimismo, se estima que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) corresponde a más de la mitad del nitrógeno utilizado en agricultura. La provisión de nitrógeno fijado permite el crecimiento de las plantas huésped en suelos que de otra manera estarían limitados por el nitrógeno, y simultáneamente reduce la pérdida de nitrógeno por desnitrificación y lixiviación.

En el presente estudio, se ha utilizado la especie *Medicago truncatula*, una leguminosa diploide anual. Esta planta presenta unas características tales como un genoma pequeño (~5 x 10⁸ pb), capacidad de autofecundación, una prolífica producción de semillas o un rápido tiempo de generación que hacen de ella un buen modelo para la investigación. Además, es una leguminosa de la familia de la alfalfa y los conocimientos adquiridos pueden ser transferidos a una especie de interés agrícola en Europa.

El objetivo de este trabajo es analizar el papel del gen *erf10* en la simbiosis *M. truncatula* – *S. medicae* en un estudio transcriptómico, se clasificó como inducible o de respuesta a los factores de nodulación. Dicho gen pertenece a la familia AP2/ERF, de la cual han sido descritos varios miembros. Para analizar el papel de este gen en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae* se obtuvieron una línea con inserción Tnt1 en dicho gen denominada ERF10. La línea mutante se cultivó junto a una línea de *M. truncatula* silvestre denominada R108. Ambas líneas se cultivaron en simbiosis con bacterias *Sinorhizobium medicae* ABS7M que expresaban el gen *LacZ*. Se compararon las plantas ERF10 con las plantas control para conocer cómo la mutación del gen *erf10* puede afectar al desarrollo de las plantas. Para ello se realizó una primera comparación de la biomasa y el número de nódulos de ambas líneas y posteriormente se procedió a la comparación de los nódulos y los cordones de infección. En primer lugar, se realizó una tinción con X-Gal para identificar la bacteria, tras lo que se procedió a las observaciones de nódulos enteros y nódulos cortados con ayuda de una cuchilla a la lupa. Posteriormente, se observaron al microscopio óptico los cordones de infección. Y, por último, se puso a punto el método para obtener cortes de los nódulos de 5 micras de ancho a los que se realizó una segunda tinción con rojo de ruterio y se observaron al microscopio óptico.

En primer lugar, se verificó la presencia del Tnt1 en las plantas ERF10 y del análisis *in silico* de la expresión del gen *erf10* se extrajo que dicho gen se expresa alrededor de las 6 horas tras la infección y es regulado negativamente por el etileno. De la comparación de ambas líneas de plantas se extrajeron resultados interesantes. Se observaron diferencias significativas en la comparación de la biomasa tanto de la parte aérea como de la raíz. Los cordones de infección de las plantas ERF10, además de observarse en gran número, fueron incompletos y anormales. Y al comparar las imágenes de los cortes de los nódulos también se apreciaron diferencias en la estructura de las células, la presencia de vacuolas y el número de gránulos de almidón entre las plantas mutantes y las control.

Índice

Glosario de términos	5
Listado de abreviaciones.....	6
1. Introducción	7
1.1 Simbiosis <i>Medicago truncatula</i> – <i>Sinorhizobium medicae</i>	9
1.2 El proceso de la nodulación	10
1.3 Regulación de la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno	12
1.4 El etileno en la simbiosis <i>Medicago truncatula</i> – <i>Sinorhizobium medicae</i>	13
1.5 Objetivos y justificación: estudio del factor de transcripción <i>erf10</i>	15
2. Material y métodos.....	17
2.1 Obtención de las muestras.....	17
2.1.1 Material utilizado.....	17
2.1.2 Crecimiento de <i>Medicago truncatula</i>	17
2.1.3 Toma de muestras del material biológico.....	18
2.2 Análisis molecular.....	19
2.2.1 Comprobación de la inserción del <i>Tnt1</i>	19
2.2.2 Cuantificación in silico de los niveles de expresión de <i>erf10</i>	20
2.3 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis <i>Medicago truncatula</i> – <i>Sinorhizobium medicae</i>	20
2.3.1 Tinción con X-Gal.....	20
2.3.2 Inclusión en resina y preparación de cortes	21
3. Resultados.....	22
3.1 Análisis molecular.....	22
3.1.1 Comprobación de la inserción del <i>Tnt1</i>	22
3.1.2 Cuantificación in silico de los niveles de expresión de <i>erf10</i>	22
3.2 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis <i>Medicago truncatula</i> – <i>Sinorhizobium medicae</i>	23
3.2.1 Medidas de biomasa vegetal	23
.....	24
3.2.2 Observación a la lupa.....	24
3.2.3 Observación al microscopio óptico	25
3.2.4 Observación de los cortes de resina al microscopio óptico.....	26
4. Discusión	29

4.1 Análisis molecular.....	29
4.2 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis <i>Medicago truncatula</i> – <i>Sinorhizobium medicae</i>	30
4.3 Perspectivas futuras	31
5. Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34

Glosario de términos

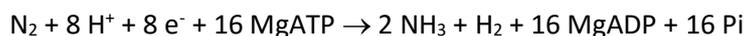
- **Cluster:** Agrupamiento de genes relacionados entre sí que se encuentran en un sector de un cromosoma.
- **Diazotrofo:** Bacterias capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno y que pueden crecer sin el aporte externo de nitrógeno.
- **Etileno:** Gas volátil formado por dos átomos de carbono enlazados mediante un doble enlace que puede regular el crecimiento de las plantas. Hormona vegetal que actúa como regulador negativo de la simbiosis leguminosa – rizobio.
- **Leguminosas:** Orden de plantas dicotiledóneas que incluye la familia de las papilionáceas. Son plantas leñosas o herbáceas con fruto tipo legumbre y con diversas especies cultivadas por su importancia en la alimentación humana y del ganado y sus aplicaciones industriales. Las leguminosas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico gracias al establecimiento de simbiosis con el género bacteriano *Rhizobium*.
- **Pelos radicales:** Células con forma tubular que se localizan en la zona pilífera de las raíces. Se trata de extensiones de una sola célula y tienen una vida media de dos a tres semanas.
- **Rizobios:** Cualquiera de un número de alfa- y beta-proteobacterias que forman nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno con las plantas leguminosas.
- **Simbiosis:** Convivencia estrecha o asociación entre dos organismos distintos. Cada uno de ellos se conoce como un simbiote.
- **Transposón:** Elemento de ADN que transporta los genes necesarios para la transposición y que se mueve a lo largo del cromosoma; si contiene otros genes además de los necesarios para la transposición, se denomina transposón compuesto. A menudo esta denominación se aplica únicamente a los elementos transponibles que también contienen genes no vinculados con la transposición.

Listado de abreviaciones

- **ACC:** 1-aminociclopropano-1-carboxilato
- **ACO:** ACCoxidasa
- **ACS:** ACCsintasa
- **AON:** Sistema de autorregulación de la nodulación
- **ET:** Etileno
- **FBN:** Fijación biológica de nitrógeno
- **hpi:** Horas tras la infección
- **PA:** Parte aérea
- **PF:** Peso fresco
- **RT:** Temperatura ambiente
- **SAM:** S-adenosil metionina
- **SAMS:** SAMsintasa
- **TFs:** Factores de transcripción

1. Introducción

El nitrógeno es un elemento esencial en el desarrollo de las plantas y un factor limitante en su crecimiento que representa aproximadamente el 2% de la materia seca total que entra en la cadena alimentaria (Santi, Bogusz and Franche, 2013). Sin embargo, aunque el nitrógeno molecular (N₂) es un recurso ilimitado que constituye el 78% de los gases atmosféricos, no es una forma utilizable por las plantas. El triple enlace del nitrógeno es muy estable, con una energía de enlace de 930 kJ/mol. La fijación del nitrógeno tiene, por tanto, una energía de activación extremadamente alta que hace que el nitrógeno atmosférico sea casi inerte en condiciones normales. El amoníaco que se produce industrialmente por el proceso de Haber-Bosch requiere una temperatura entre 400 y 500°C y presiones de nitrógeno e hidrógeno de decenas de miles de kilopascales para conseguir la energía de activación necesaria (revisado en Nelson and Cox, 2014). El nitrógeno molecular debe reducirse química o biológicamente, mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN), a una forma accesible para la planta (revisado en Udvardi and Poole, 2013). Sin embargo, este proceso tiene lugar a temperaturas biológicas y a 0,8 atm de presión, por lo que la elevada barrera de activación debe superarse por otros medios. Esto se consigue, al menos en parte, por la unión y la hidrólisis del ATP (Nelson and Cox, 2014). Durante el proceso de FBN, el nitrógeno atmosférico se convierte en amoníaco con la ayuda de una enzima clave llamada nitrogenasa, un complejo de proteínas altamente conservado que cataliza la siguiente reacción:



Los componentes claves del complejo de la nitrogenasa son la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa. La dinitrogenasa reductasa (M_r 60.000) es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Contiene un único centro redox de tipo 4Fe-4S, unido entre las subunidades, que puede ser oxidado y reducido por un electrón. Tiene también dos lugares de unión ATP/ADP (un lugar en cada subunidad). La dinitrogenasa (M_r 240.000) es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con dos cofactores con Fe que transfieren electrones. Uno de ellos, el agregado P, tiene un par de centros 4Fe-4S, que comparten un átomo de azufre, formando un centro 8Fe-7S. El segundo cofactor de la dinitrogenasa, el cofactor FeMo, es una estructura compuesta por 7 átomos de Fe, 9 átomos de S inorgánico, una cadena lateral de Cys y un único átomo de carbono en el centro del agregado FeS. Un átomo de molibdeno también forma parte del cofactor, con ligandos que incluyen tres átomos de S inorgánico, una cadena lateral de His y dos átomos de oxígeno de una cadena de homocitrato, que es parte esencial del cofactor FeMo (Nelson and Cox, 2014).

A pesar de la importancia de la FBN, muy pocos organismos como algunas bacterias o las algas cianofíceas pueden realizar este proceso. La explicación probablemente se encuentra en la historia de la atmósfera terrestre y los cambios que sufrió a través del tiempo. La primera atmósfera de la Tierra era anaeróbica y estaba compuesta principalmente de amoníaco y metano, y la fijación de nitrógeno no era necesaria. Sin embargo, cuando las especies fotosintéticas que producían oxígeno aparecieron por primera vez, los suministros de nitrógeno reducido fueron gradualmente oxidados a nitrato. Algunas bacterias pronto adquirieron la capacidad de utilizar el nitrato como un oxidante terminal, convirtiendo eventualmente los suministros disponibles de nitrato en dinitrógeno. Una vez que las formas fijas de nitrógeno se habían convertido en dinitrógeno, la evolución de un proceso de fijación de nitrógeno era esencial para que la vida continuara. En este punto de la historia evolutiva, las especies eucariotas probablemente ya estaban muy evolucionadas y sólo las bacterias poseían tanto una capacidad para el metabolismo anaeróbico como las reductasas apropiadas que podían evolucionar a nitrogenasas (Ausubel, 1986).

La limitada biodisponibilidad del nitrógeno y la dependencia del crecimiento de los cultivos en este elemento han generado una industria masiva de fertilizantes basados en nitrógeno en todo el mundo. La población mundial no podría haber pasado de los 1600 millones que había en 1900 a los actuales más de 6000 millones sin la síntesis de amoníaco a través del proceso industrial de Haber-Bosch, que puede considerarse la invención más importante del siglo XX. Aunque la fertilización del nitrógeno ha disminuido el hambre en muchas regiones, esto ha tenido un coste ambiental importante. El proceso Haber-Bosch implica la producción de grandes cantidades de dióxido de carbono (aproximadamente 275 millones de toneladas al año) a expensas de los combustibles fósiles como el gas natural y el carbón (Olivares, Bedmar and Sanjuán, 2013).

Las plantas leguminosas tienen la capacidad de establecer relaciones simbióticas con bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium*. Anualmente, la FBN se estima en alrededor de 175 millones de toneladas de nitrógeno fijado, de las cuales cerca del 79% corresponde a la fijación terrestre (Wani, Rupela and Lee, 1995). Además, la FBN corresponde a más de la mitad del nitrógeno utilizado en agricultura (Prescott, Harley and Klein, 2008). La provisión de nitrógeno fijado permite el crecimiento de las plantas huésped en suelos que de otra manera estarían limitados por el nitrógeno, y simultáneamente reduce la pérdida de nitrógeno por desnitrificación y lixiviación. Además, proporciona nitrógeno fijo residual a los cultivos posteriores no legumbres, como los cereales, por lo que las leguminosas se han utilizado en rotaciones de cultivos durante miles de años.

Varios géneros microbianos son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas. Aquí se incluyen las α -proteobacterias, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*. Colectivamente estos géneros habitualmente se denominan rizobios. Asimismo, con el descubrimiento de las β -proteobacterias *Burkholderia caribensis* y *Ralstonia taiwanensis*, se ha extendido la diversidad filogenética de los rizobios (Prescott, Harley and Klein, 2008).

1.1 Simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

M. truncatula es una leguminosa de la familia de la alfalfa que presenta unas características tales como un genoma diploide y pequeño ($\sim 5 \times 10^8$ pb), capacidad de autofecundación, una prolífica producción de semillas o un rápido tiempo de generación que hacen de ella un buen modelo para la investigación (Cook, 1999). Su distribución natural abarca herbazales y campos de cultivo ubicados entre los 150 hasta los 1000 metros de altitud. Se localiza en oeste y sur de Europa, norte de África, oeste de Asia y Macaronesia y está naturalizada en Australia (GBIF.org).

S. medicae es una bacteria aerobia gram-negativa perteneciente a las α -proteobacterias que, al igual que otros rizobios, se puede encontrar como organismo de vida libre en los suelos. Se trata de bacterias quimioorganotróficas mesófilas cuya temperatura óptima se encuentra alrededor de los 28°C. *S. medicae* tiene tres unidades de replicación: (1) un cromosoma que alberga los genes del mantenimiento celular; (2) un *chromid* donde se agrupan muchos de los genes implicados en la síntesis de polisacáridos; y (3) un megaplásmido donde se localizan los genes *nod* y los genes implicados en la FBN (Bailey *et al.*, 2011). Un *chromid* es un cromosoma secundario distinto de un cromosoma o un megaplásmido. Las bacterias tienen un único cromosoma con los genes esenciales para su mantenimiento. Sin embargo, se han descubierto grandes replicones con genes esenciales que se han denominado *chromids* (Harrison *et al.*, 2010).

Aunque las raíces de las plantas están expuestas a multitud de microorganismos en el suelo, sus paredes celulares forman una fuerte barrera protectora contra la mayoría de las especies dañinas (Jones *et al.*, 2009). Sin embargo, *M. truncatula* es eficientemente colonizada por los simbiontes microbianos modelo como *S. medicae*. Al parecer *M. truncatula* y *S. medicae* sufrieron una evolución conjunta (Cook, 1999).

1.2 El proceso de la nodulación

La formación de nódulos (Figura 1) es, por lo tanto, una relación mutualista beneficiosa para ambos socios simbióticos; la planta huésped proporciona a los rizobios carbono, que es una fuente de energía para el crecimiento y las funciones llevadas a cabo por las bacterias, mientras que los rizobios fijan el N₂ atmosférico y proporcionan a la planta una fuente de nitrógeno reducido en forma de amonio (Sulieman and Tran, 2014). Los nódulos de leguminosas son órganos muy complejos que contienen varios procesos de interacción que operan a distintos niveles, incluyendo, al menos, la formación de nódulos, el metabolismo del carbono, el suministro de oxígeno, la redox celular y el transporte transmembrana (Terpolilli, Hood and Poole, 2012).

La FBN presenta algunas características universales en todas las leguminosas estudiadas hasta la fecha, incluyendo el establecimiento de un ambiente microaerobio dentro de los nódulos como requisito previo para la fijación bacteriana de nitrógeno; el transporte de carbono reducido de la planta a los rizobios, principalmente como ácidos dicarboxílicos; y el transporte del nitrógeno fijado de los rizobios a la planta, principalmente como amoníaco (Udvardi and Poole, 2013).

La nodulación se inicia mediante un intercambio de señales entre los socios simbióticos. El proceso comienza cuando los exudados de las raíces de las plantas, en su mayoría flavonoides,

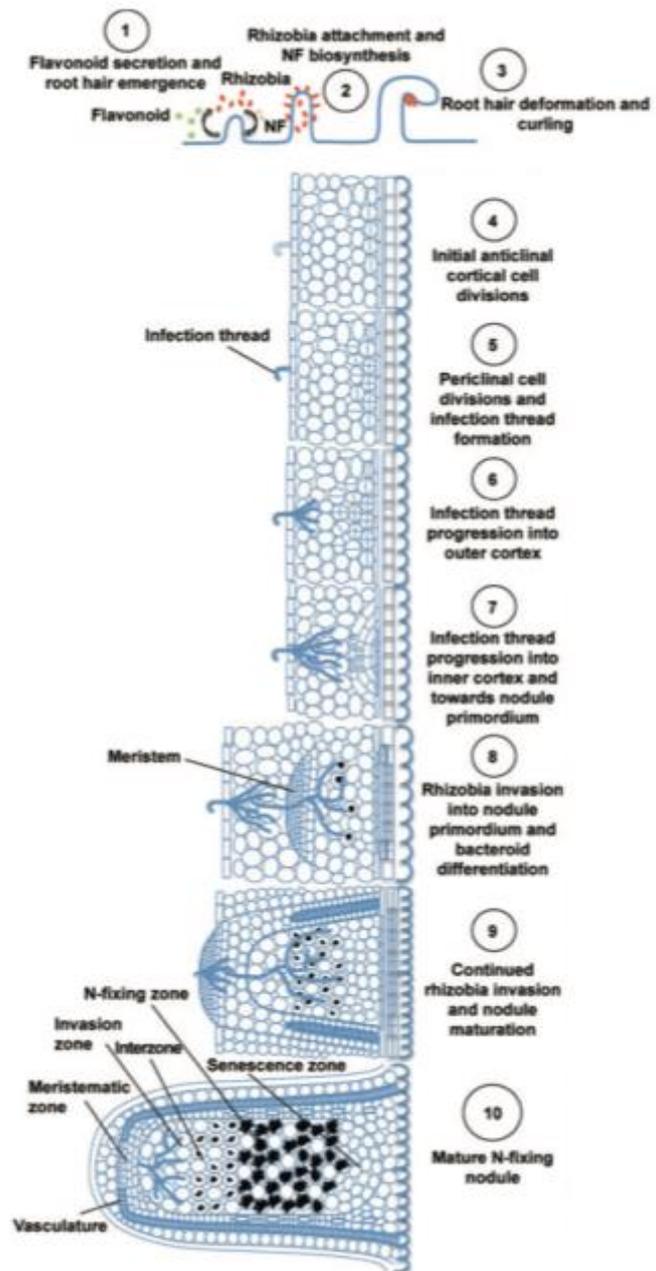


Figura 1: Etapas de la formación de nódulos. (modificado a partir de Ferguson *et al.*, 2010).

son percibidos por los rizobios que activan los genes de nodulación para producir y segregar los factores Nod (Mortier, Holsters and Goormachtig, 2012). Los factores Nod se unen a receptores de quinasas tipo LysM específicos localizados en la membrana plasmática y desencadenan una vía de señalización de Ca^{2+} , que activa la transcripción de genes implicados en el desarrollo de los nódulos (Oldroyd *et al.*, 2011). Estos cambios están estrechamente relacionados con el cese transitorio y la posterior reactivación del crecimiento polar de los pelos radicales que tiene como consecuencia la formación de una curvatura característica de los pelos radicales conocida como bastón de pastor que atrapa las bacterias que colonizarán el órgano nodular (Larrainzar *et al.*, 2015).

La señalización de los factores Nod también da lugar a la desdiferenciación y la división de las células corticales de la raíz que forman los nódulos (Udvardi and Poole, 2013). Los rizobios penetran en los pelos radicales tras una hidrólisis de la pared celular (Vanspronsen *et al.*, 1994). La colonización por parte de los rizobios de las células de la raíz es facilitada por los cordones de infección, una estructura tubular formada por la invaginación de la pared celular y la membrana plasmática formada tras la unión de los rizobios al pelo radical. Los rizobios crecen y se dividen dentro de los cordones de infección, y éstos se ramifican dentro del tejido cortical de la raíz y finalmente depositan la carga bacteriana dentro de múltiples células corticales rodeados de una membrana vegetal llamada membrana simbiosómica (Udvardi and Poole, 2013). Los rizobios junto a la membrana simbiosómica reciben el nombre de simbiosoma. Los simbiosomas continúan creciendo y dividiéndose hasta que las células vegetales infectadas tienen miles de ellos. En *Medicago truncatula*, se desarrollan nódulos cilíndricos indeterminados con diferentes zonas (Figura 2): la zona meristemática (zona I) en la punta de crecimiento; la zona de invasión, que contiene hilos de infección que entregan los rizobios a las células vegetales (zona II); una zona de transición o interzona (zona II-III), en la cual los rizobios experimentan diferenciación; la zona de fijación de nitrógeno (zona III); y una zona de senescencia proximal a la raíz, en la cual se degradan los rizobios y cesa la fijación de nitrógeno que correspondería a la zona IV (Vasse *et al.*, 1990). Las

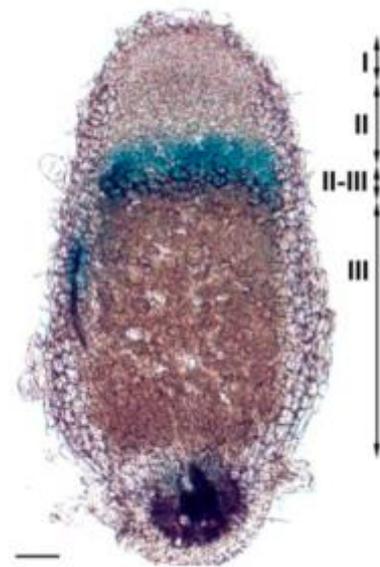


Figura 2: Diferentes zonas en las que se divide un nódulo: la zona I es la zona meristemática; la zona II es la zona de infección; la zona II-III es la interzona y la zona III es la zona de fijación de nitrógeno. La zona de senescencia (zona IV) se ha incluido en la imagen como zona III (modificado a partir de Farkas *et al.*, 2014).

bacterias en los simbiosomas se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno dentro de las células de la zona de fijación (Mylona, Pawlowski and Bisseling, 1995).

Los rizobios de los simbiosomas se diferencian a formas fijadoras de nitrógeno conocidas como bacteroides que implica la inducción de genes para la fijación de nitrógeno (genes *nif*) (Udvardi and Poole, 2013). Los genes para la fijación de nitrógeno en *Rhizobium* se dividen generalmente en dos grupos: los que tienen homólogos en sistemas de fijación de nitrógeno de vida libre, denominados genes *nif*; y aquellos que se ha demostrado que son necesarios para la fijación simbiótica de nitrógeno, pero cuya función no se conoce como análoga a una función de vida libre, denominados genes *fix* (Long, 1989). Los genes *nif* y *fix* están organizados en distintos *clusters* cuya estructura y localización genómica son específicos de cada especie (Fischer, 1994).

1.3 Regulación de la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno

Al ser la formación de nódulos un proceso altamente costoso intervienen en su regulación distintos factores ambientales entre los que se encuentran la disponibilidad de nitrógeno en el suelo y las señales endógenas de las plantas, incluidas las hormonas vegetales (revisado en Larrainzar *et al.*, 2014). Factores tales como la composición del suelo, el contenido de agua, la temperatura y el pH también pueden influir en el crecimiento de plantas y rizobios y en el establecimiento de nódulos. De hecho, la acidez del suelo por sí sola es responsable de pérdidas significativas en la producción global de leguminosas (Ferguson, Lin and Gresshoff, 2013).

El número de nódulos en las raíces de las plantas está controlado por un proceso sistémico denominado de autorregulación de la nodulación (AON). No se conoce la naturaleza exacta ni la coordinación de las señales que regulan AON, aunque algunas evidencias experimentales sugieren que no se trata de una señal derivada de las bacterias y no depende enteramente de la fijación de nitrógeno en el nódulo (Reid *et al.*, 2011). No obstante, sí se sabe que dicho sistema de regulación se inicia durante el desarrollo del nódulo por la síntesis de una señal derivada de la raíz llamada 'Q' (Ferguson *et al.*, 2010). Este hecho ha sido demostrado en varias plantas con nodulación determinada e indeterminada, como *M. truncatula* (Mortier, Holsters and Goormachtig, 2012).

La FBN, al igual que la nodulación, es muy costosa en términos de energía requiriendo grandes cantidades tanto de potencial reductor como de fosfato de alta energía (ATP). La FBN es probablemente el proceso biológico más importante después de la fotosíntesis (Unkovich, 2013) y debido a su alto coste energético se bloquea ante perturbaciones ambientales. Se ha

demostrado que tanto el estrés abiótico como el biótico provocan una inhibición rápida de la FBN en leguminosas cultivadas bajo condiciones simbióticas. Uno de los factores abióticos estudiados más importantes ha sido el estrés por sequía. El efecto negativo de la sequía sobre la FBN se debe principalmente a tres factores: el efecto que causa en la infección de las leguminosas por las bacterias, los efectos que tiene sobre el crecimiento y desarrollo de los nódulos y el efecto sobre el funcionamiento de los nódulos (Arrese-Igor *et al.*, 2011). Asimismo, la aplicación externa de metales pesados también provoca condiciones estresantes que conducen a la inhibición de las tasas de FBN en leguminosas (Larrainzar *et al.*, 2014). Además de los estreses abióticos, el suministro de nitrógeno inorgánico es uno de los factores más estudiados que inhiben la FBN. Entre las hipótesis que se han planteado, se habla de que la aplicación de nitrato produce una alteración de la permeabilidad al oxígeno (Arrese-Igor *et al.*, 1997). Por otra parte, la inhibición de la FBN podría deberse a la unión del óxido nítrico a la leghemoglobina (Becana *et al.*, 2010).

1.4 El etileno en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

Dada la compleja reprogramación de desarrollo que requiere la infección por parte de los rizobios y la organogénesis de los nódulos, no es sorprendente que estos procesos estén rigurosamente regulados por la planta. En particular, la hormona vegetal etileno (ET) ha sido reconocida durante mucho tiempo como un regulador negativo de la simbiosis leguminosa - rizobio (Lee and LaRue, 1992). El gas de etileno (C₂H₄) juega un papel central en las interacciones de las plantas con microorganismos e insectos, lo que se ejemplifica por el hecho de que una variedad de estos organismos produce y percibe el etileno y lo utiliza como una señal (Groen and Whiteman, 2014).

La ruta de la biosíntesis del ET es relativamente sencilla. La metionina, su precursor, es proporcionada por el ciclo Yang, que es uno de los mecanismos utilizados por las plantas para reciclar el azufre. Con la adición de una molécula de ATP, la metionina se convierte en S-adenosil metionina (SAM) gracias a la acción de la enzima SAMsintasa (SAMS). A continuación, la enzima ACCsintasa (ACS) cataliza la reacción de SAM a ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato). En presencia de oxígeno y ascorbato, el ACC se convierte en ET, cianuro y CO₂ mediante la acción de ACO (ACCoxidasas) (Guinel, 2015).

Gracias al uso de técnicas moleculares se ha descubierto una posible ruta de señalización del ET (Figura 3). El ET es percibido por una familia de receptores localizados en el retículo endoplasmático llamados ETR1 (Respuesta a ET 1) que son una estructura similar, tanto en la secuencia como en la estructura, a histidinas kinasas bacterianas de dos componentes.

Cada receptor tiene un dominio transmembrana N-terminal que se une al ET a través de un cofactor de cobre. Los receptores funcionan de forma redundante para regular de forma negativa las respuestas del ET mediante CTR1 (Respuesta Triple Constitucional 1). Aguas abajo de CTR1 se localiza EIN2 (ET Insensible 2), una proteína localizada en el retículo endoplasmático con un dominio intracelular que actúa como regulador positivo de señalización del ET. En ausencia de ET, EIN2 mantiene su dominio intracelular fosforilado. Sin embargo, cuando el ET está presente, el dominio interno de EIN2 se desfosforila y una proteasa desconocida corta dicho dominio que viaja hasta el núcleo. Una vez dentro del núcleo, mediante una proteína desconocida, se une a los factores de transcripción EIN3 activando los genes de respuesta a ET (Qiao *et al.*, 2012).

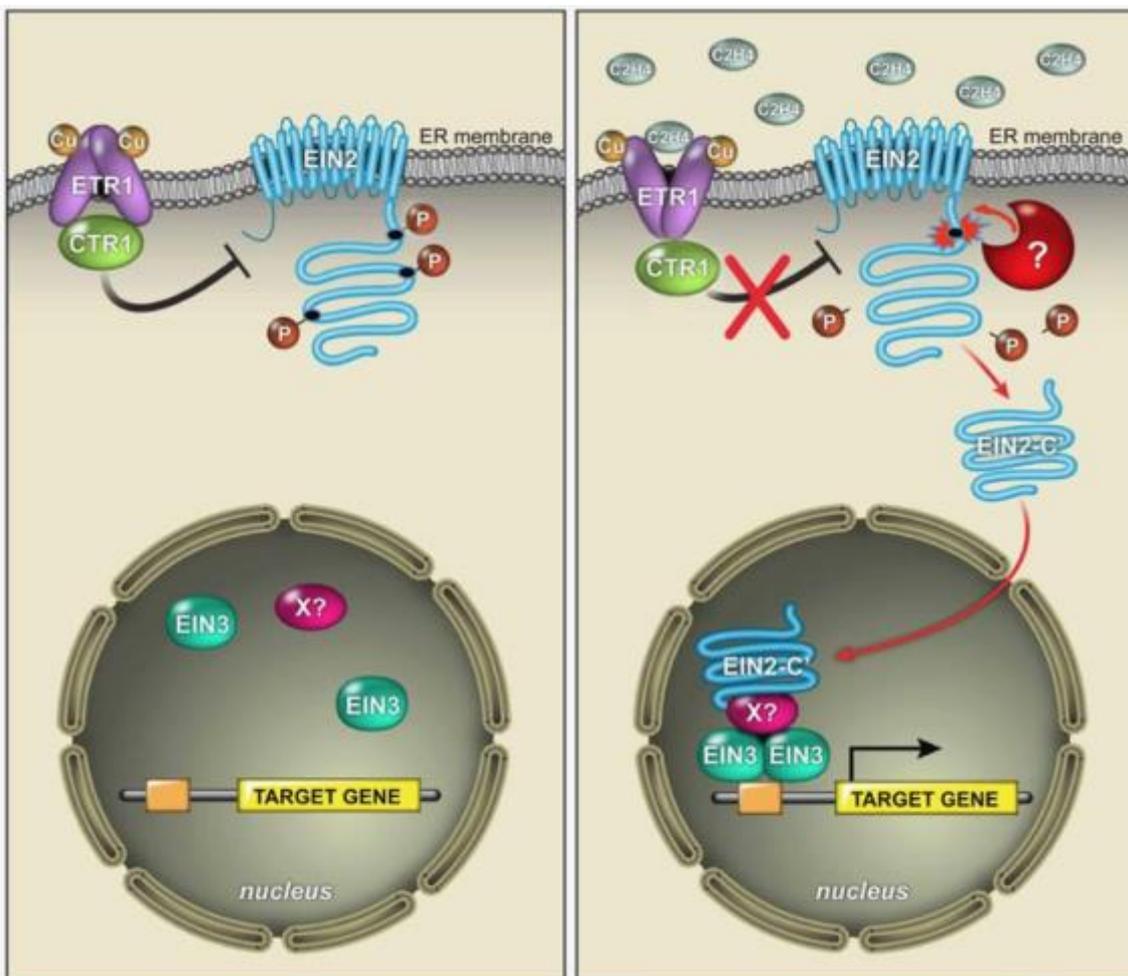


Figura 3: Esquema de la ruta de señalización del ET en *M. truncatula* (Qiao *et al.*, 2012).

El ET tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de nódulos, la iniciación de cordones de infección, la formación del bastón de pastor en los pelos radicales, la expresión génica temprana y el aumento de calcio en la respuesta de la planta a los factores Nod de *S. medicae*

(Oldroyd, Engstrom and Long, 2001). Muchas respuestas mediadas por el ET durante la nodulación son la consecuencia de la señalización del factor Nod, posiblemente a través de la inducción por dicho factor de nuevos sistemas de biosíntesis, percepción y transcripción de ET. La inducción de ET por el factor Nod es la mayor ruta de regulación negativa para la nodulación. Sin embargo, el ET también puede interferir como regulador positivo en la transcripción dependiente de factores Nod, puede actuar de forma independiente a los factores Nod para regular la respuesta de defensa del huésped y también puede modular la transcripción basal de ciertos componentes de señalización del factor Nod antes de la percepción de dicho factor (Larrainzar *et al.*, 2015). Estudios recientes sugieren que la biosíntesis de ET se induce principalmente en la epidermis durante la infección por rizobios y, posteriormente, en la región meristemática en tejidos de nódulos maduros (Larrainzar *et al.*, 2015). No obstante, en la actualidad no se conoce con exactitud la función del ET en la regulación de la nodulación, organogénesis y FBN.

1.5 Objetivos y justificación: estudio del factor de transcripción *erf10*

Las plantas contienen numerosos genes que codifican factores de transcripción (TFs), que regulan la expresión de los genes aguas abajo mediante la unión a sus elementos de acción. La superfamilia de los elementos de unión AP2/ERF es uno de los grupos más grandes de TFs en plantas y participa en muchos procesos importantes incluyendo el crecimiento de la planta, el desarrollo y las respuestas al estrés (Shu *et al.*, 2016). El dominio ERF fue identificado por primera vez en como un motivo conservado en cuatro proteínas de unión al ADN en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*). Estas proteínas fueron nombradas como EREBP1, 2, 3, y 4 y actualmente se han renombrado como ERF1, 2, 3 y 4 y se ha demostrado que se unen específicamente a una caja GCC, que es una secuencia

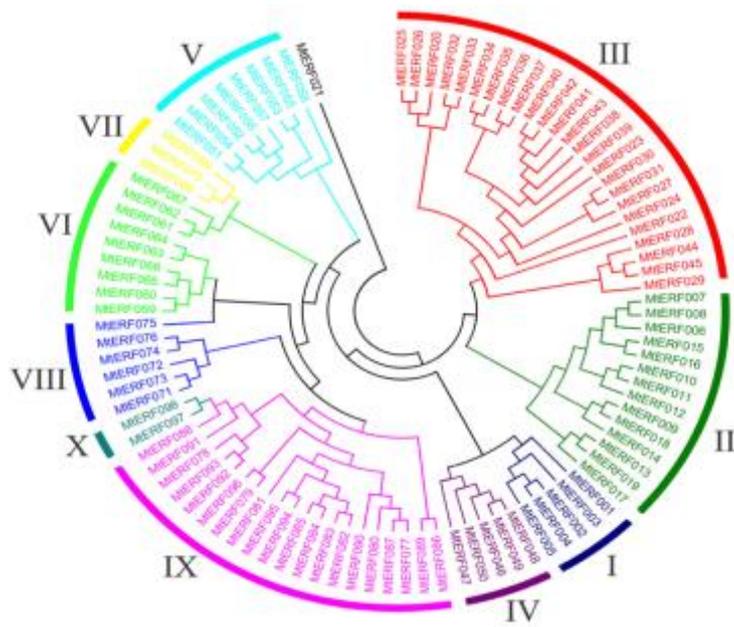


Figura 4: Árbol filogenético de la familia ERF en *M. truncatula* (Shu *et al.*, 2016).

de ADN implicada en la transcripción de genes que responden al ET (Nakano *et al.*, 2006).

En estudios aún preliminares se ha descrito que *M. truncatula* contiene 98 miembros de la familia ERF en *M. truncatula*, un número menor que el de otras plantas como *Arabidopsis* (122 miembros), vid (122 miembros), soja (169 miembros) o arroz (145 miembros) (Shu *et al.*, 2016). Los genes codificantes para la familia de TFs ERF de *M. truncatula* pueden dividirse en 10 grupos de acuerdo con la similitud de las secuencias ERF de *Arabidopsis* (Figura 4).

El TF objeto de este trabajo está codificado por un gen perteneciente al grupo II, consta de 203 aminoácidos y no presenta intrones (Shu *et al.*, 2016). Estudios previos han identificado a *erf10* como un gen que se induce en *M. truncatula* a las pocas horas tras la inoculación con *S. medicae* siguiendo un patrón de expresión dependiente de señalización por los factores Nod (Larrainzar *et al.*, 2015).

El objetivo general de este trabajo es analizar el papel de la hormona etileno en el establecimiento de la simbiosis a través del estudio de uno de los TF que interviene en la cascada de señalización denominado *erf10*. Para cumplir el objetivo principal, el trabajo se ha dividido en dos objetivos específicos. El primero de ellos es la comprobación de la inserción del transposón que provoca el silenciamiento del gen objeto de estudio. Dentro de este segundo objetivo también se hizo un análisis *in silico* de la expresión de este gen en las etapas iniciales tras la inoculación con *Rhizobium*. El segundo de los objetivos fue el crecimiento y caracterización de las plantas mutantes en el gen *erf10*. Para ello se cultivaron las plantas (mutantes y control) en medio aeropónico y, tras 4 – 5 semanas de crecimiento, se cosecharon para poder comparar su biomasa y su número de nódulos. También se recogió material vegetal de dichas plantas para observar defectos en la formación de cordones de infección y para la observación de los nódulos a la lupa y al microscopio.

2. Material y métodos

2.1 Obtención de las muestras

2.1.1 Material utilizado

Las plantas empleadas para el estudio fueron las *M. truncatula* mutantes ERF10, que presentan en el gen *erf10* una inserción del transposón Tnt1, y las *M. truncatula* R108 de la colección de mutantes del Noble Research Institute (Oklahoma, EEUU) utilizadas como *wild type* o silvestre.

El rizobio empleado para inocular las plantas fue *S. medicae* ABS7M, una bacteria que sintetiza la enzima β -galactosidasa y, por lo tanto, se puede detectar mediante tinción con X-Gal (Larrainzar *et al.*, 2015).

2.1.2 Crecimiento de Medicago truncatula

Las semillas de *M. truncatula* ERF10 y R108 fueron peladas, esterilizadas, escarificadas con ácido sulfúrico y colocadas en placas de agar al 0,7% durante 48 horas a 4°C para sincronizar su germinación. Posteriormente, las placas de agar con las semillas fueron colocadas a temperatura ambiente (RT) y en oscuridad durante 24 horas para su germinación. Una vez transcurrido este tiempo, las plántulas fueron ubicadas para su crecimiento en medio aeropónico. Las plantas se crecieron durante 4 – 5 semanas.

Para el cultivo aeropónico se empleó un contenedor de un volumen aproximado de 70 l con un vaporizador en la base donde se vierte el medio de cultivo líquido. Está cubierto por una superficie con perforaciones a través de las cuales se introduce la radícula de las plantas dejando su parte aérea (PA) en el exterior y su radícula en contacto con el medio vaporizado. Dicha superficie se cubrió con film adhesivo de color negro para evitar el paso de la luz, ya que favorece la proliferación de otros organismos no deseados tales como hongos y algas. La superficie con las plántulas se ajusta al recipiente mediante pinzas para evitar la pérdida de medio de cultivo (Figura 5). Asimismo, la PA de las plantas se cubrió con flim transparente con pequeños agujeros para evitar la desecación.

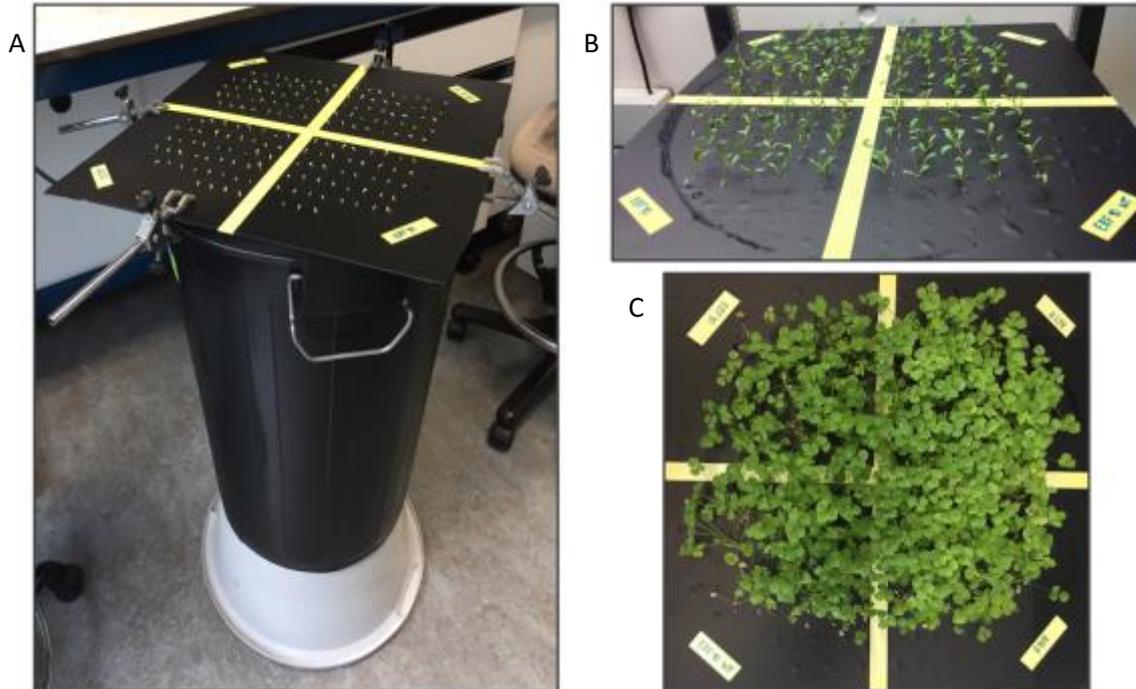


Figura 5A: Recipiente del cultivo aeropónico cubierto por la superficie plástica sujeta mediante pinzas y perforada a través de la cual se han introducido las plántulas. **Figura 5B:** Crecimiento de las plantas a través de la superficie plástica (plantas de una semana). **Figura 5C:** Crecimiento de las plantas a través de la superficie plástica (plantas de 4 semanas).

El medio Fahræus (Barker *et al.*, 2006) fue el medio de cultivo empleado para el crecimiento de las plantas. Cuando las plantas se colocaron en el cultivo aeropónico se vertieron 7 litros de medio y se dejaron crecer en cámara de crecimiento con periodo de luz desde las 8 am hasta las 10 pm, usando una mezcla de lámparas tipo Cool white y Grow lux y temperatura constante entre 20 y 24°C. Cada 7 días se realizó un cambio de medio, eliminando el medio restante, limpiando el cubo contenedor y el vaporizador y añadiendo 7 litros de nuevo medio.

Se creció *S. medicae* ABS7M en medio YEM a 28°C durante 48 horas. El cultivo se lavó tres veces y finalmente se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril desde una densidad óptica 600 hasta 0,001 que fue usada para inocular el cultivo aeropónico. Se realizaron dos inoculaciones: una a las 24 horas de colocar las plántulas en el medio aeropónico y otra transcurridas 72 horas.

2.1.3 Toma de muestras del material biológico

Transcurridas cuatro semanas se procedió a la cosecha del material biológico de las plantas ERF10 tomando medidas del peso fresco (PF) de las partes aéreas, de las raíces noduladas y del número de nódulos. De este material se conservaron muestras de PA y raíz

nodulada (de cada planta 4 muestras de PA y 4 muestras de raíz todas ellas de entre 0,05 y 0,3 g) a -80°C para comprobar la presencia del transposón y poder, en un futuro, cuantificar los niveles de expresión de forma experimental. El resto de muestras de PA fueron desechadas. Una semana después se procedió de la misma manera con las plantas R108. De las plantas ERF10 se muestrearon un total de 36 ejemplares mientras que de las R108 se muestrearon un total de 35.

2.2 Análisis molecular

2.2.1 Comprobación de la inserción del Tnt1

Para asegurar la presencia del transposón Tnt1 se realizó una PCR del ADN genómico extraído por columnas de purificación con el kit Gene MATRIX Plant & Fungui DNA Purification de EURx. Para la realización de este experimento se utilizaron las muestras de PA (4 muestras de ERF10 y 4 muestras de R108) que habían sido conservadas a -80°C tras el muestreo. El primer paso fue preparar las columnas de purificación añadiendo 40 µl de tampón de activación P tras lo que se mantuvieron a RT hasta su uso. En total se prepararon 8 columnas, una para cada muestra. El siguiente paso fue la homogenización de las muestras con nitrógeno líquido en un mortero. En un tubo de microcentrífuga se añadió entre 100 y 20 mg de muestra para, a continuación, añadir 400 µl de tampón Lyse P y resuspender la muestra. Se procedió de la misma manera con todas las muestras. A continuación se añadieron 3 µl de RNasa a cada tubo. Se agitaron las muestras con ayuda del vortex y se incubaron 30 minutos a 65°C. Después se añadió a cada tubo de microcentrífuga 130 µl de tampón AC mezclando por inversión y posteriormente incubando 5 minutos en hielo. Se centrifugó el lisado durante 10 minutos a 14000 rpm y se transfirieron 400 µl de los sobrenadantes a nuevos tubos de microcentrífuga añadiendo a continuación 350 µl del tampón Sol P. Se añadieron seguidamente 250 µl de etanol al 96% y se mezcló y centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm. Posteriormente se transfirieron 650 µl del sobrenadante a una columna de centrifugado y se centrifugó durante un minuto a 12000 rpm desechando tras el centrifugado el líquido de la columna. Este paso se repitió con el sobrenadante restante. El siguiente paso fue añadir 500 µl de tampón Wash PX a la columna de centrifugado y centrifugar 2 minutos a 12000 rpm para desechar el líquido de la columna. Este paso se repitió dos veces. Por último, se colocó la columna en un nuevo tubo y se añadieron 100 µl de tampón Elution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) calentado a 70°C para eluir el ADN. Se incubó la columna con el tubo durante 3 minutos a RT tras lo que se centrifugó durante un minuto a 12000 rpm. Como control se utilizó ADN genómico de una línea R108 extraído por el mismo método.

Para cada reacción de la PCR se usaron 2 µl del ADN diluido a lo que se añadió: 9,1 µl de agua MiliQ estéril; 1,5 µl de tampón ExTaq; 1,2 µl de dNTPs; 0,6 µl del primer forward (fw); 0,6 µl del primer reverse (rev) y 0,075 µl de la enzima ExTaq (Takara). El marcador empleado fue DirectLoad™ 1 kb DNA Ladder (Sigma).

Los *primers* utilizados para amplificar el gen *erf10* fueron el *erf10* fw (CCTTCTCTCCATGATAAGTCACTG) y el *erf10* rev (CAAGCGATGGAGAATAGTTTGA). Para comprobar la inserción del Tnt1 en las plantas ERF10 se usaron los *primers erf10* fw y Tnt1 rev (CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG).

2.2.2 Cuantificación *in silico* de los niveles de expresión de *erf10*

Como estimación de la cuantificación de los niveles de expresión de *erf10* se realizó una cuantificación *in silico* basada en el trabajo de Larrainzar *et al.* (2015).

2.3 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

2.3.1 Tinción con X-Gal

La tinción con X-Gal permite detectar la expresión de la enzima β-galactosidasa codificada en el gen *lacZ* y, por lo tanto, la presencia de *S. medicae* ABS7M microsimbionte.

Para comenzar con el protocolo de tinción con X-Gal (modificado a partir de Nishimura, Ohmori and Kawaguchi, 2002) se incubaron las muestras de raíz recogidas en la toma de muestras del material biológico en glutaraldehído 200 mM 1,25%, tampón de fosfato de sodio a pH 7 durante una hora en bomba de vacío. De este modo se consigue inactivar la actividad galactosidasa interna. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón fosfato de sodio 200 mM y posteriormente se añadió la solución fosfato de sodio que contenía 0,8 mg/ml de X-Gal (0,08%), ferrocianuro potásico 5 mM y ferrocianuro potásico 5 mM y se incubó durante una hora y media en bomba de vacío tras lo que se dejó durante toda la noche (o/n) a 28°C. El siguiente paso fue realizar dos lavados con tampón fosfato de sodio 200 mM e incubar o/n en solución 8 : 2 : 1 de hidrato de cloral : glicerol : agua estéril a RT para aclarar las células y conseguir una mejor observación de las muestras. Una vez realizados estos pasos se eliminó la solución hidrato de cloral : glicerol : agua estéril y se sustituyó por tampón fosfato de sodio 200 mM tras lo que se procedió a la observación de parte de las muestras (nódulos enteros y nódulos cortados longitudinalmente con ayuda de una cuchilla) a la lupa SZ-ST Olympus y al microscopio óptico Olympus BX40F y a la toma de imágenes con la cámara Olympus Soft Imaging Solutions

GMBH. Las muestras que no fueron utilizadas para la observación se conservaron a 4°C para realizar el protocolo de inclusión en resina.

2.3.2 Inclusión en resina y preparación de cortes

Las muestras que previamente se habían conservado a 4°C se lavaron con agua estéril tras lo que se realizaron baños de 30 minutos a RT en concentraciones crecientes de etanol 10%, 30% y 50%. Una vez realizados estos pasos, se dejaron o/n en solución de etanol al 70% a 4°C. El siguiente paso fue realizar un baño de 30 minutos a RT en solución de etanol al 90% y tres baños sucesivos de 30 minutos a RT en solución de etanol al 98%. Una vez concluido se dejaron o/n en solución de preparación que contenía 0,1 g Hardener I/10 ml resina Technovit 7100 a 4°C. Las muestras se depositaron en las cápsulas que previamente habían sido etiquetadas colocando un nódulo por cada cápsula. A cada cápsula se añadió 0,5 ml de solución de inclusión que contenía 0,2 ml Hardener II/3 ml solución de preparación. Este paso se realizó en grupos de máximo 6 cápsulas debido a la rápida polimerización de la solución de inclusión.

Se hicieron cortes de 5 micras de ancho de las muestras encapsuladas haciendo uso del microtomo giratomo manual MICROM HM 325. Los cortes se colocaron en portaobjetos poniendo una gota de agua destilada sobre el portaobjetos previamente a la colocación del corte para facilitar su expansión y evitar la formación de arrugas en la muestra que dificulten su observación. Los portaobjetos se dejaron o/n a RT para que las muestras se secaran y fijasen.

Los cortes obtenidos se tiñeron con rojo de ruterio, una tinción inespecífica (Franssen *et al.*, 2015). Se disolvieron 0,3 g de Ruthenium red en 100 ml de agua destilada y se agitó durante 20 minutos a RT hasta conseguir una disolución completa tras lo que se filtró con papel de filtro. Con esta solución se cubrieron las muestras fijadas anteriormente en los portaobjetos durante 30 minutos a RT y posteriormente se aclararon con agua destilada y se dejaron secar. Tras este proceso se pudieron observar al microscopio óptico Olympus BX40F y a la toma de imágenes con la cámara Olympus Soft Imaging Solutions GMBH.

3. Resultados

3.1 Análisis molecular

3.1.1 Comprobación de la inserción del Tnt1

El resultado de la PCR (Figura 6) reveló la amplificación del gen *erf10* tanto en las muestras ERF10 como en las R108 y la amplificación en las muestras ERF10 del fragmento de ADN localizado entre los *primers erf10 fw* y *Tnt1 rev*. El gen *erf10* consta de unas 1,12 kb, tamaño que coincide con la amplificación de las muestras R108 realizadas con los *primers erf10 fw* y *erf10 rev*.

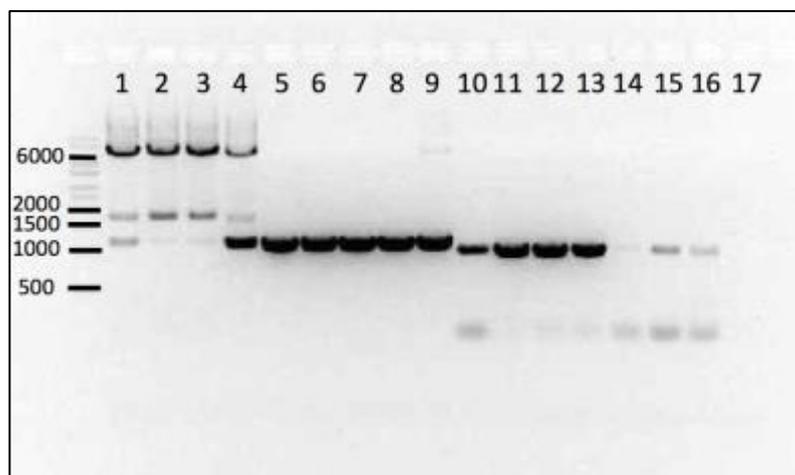


Figura 6: Resultados de la PCR. Las muestras 1 – 4 corresponden a la amplificación del gen *erf10* de las muestras ERF10 amplificadas con los *primers erf10 fw* y *erf10 rev*. Las muestras 5 – 8 corresponden a la amplificación del gen *erf10* de las muestras R108 amplificadas con los *primers erf10 fw* y *erf10 rev*. La muestra 9 corresponden al control R108 amplificado con los *primers erf10 fw* y *erf10 rev*. Las muestras 10 – 13 corresponden a las muestras ERF10 amplificadas con los *primers erf10 fw* y *Tnt1 rev*. Las muestras 14 – 17 (no han amplificado) corresponden a las muestras R108 amplificadas con los *primers erf10 fw* y *Tnt1 rev*.

3.1.2 Cuantificación in silico de los niveles de expresión de erf10

En el análisis realizado por (Larrainzar *et al.*, 2015), se analizó la relación de la percepción de los factores Nod con la expresión de los elementos de unión AP2/ERF, que son TFs responsables de la expresión de genes de respuesta al ET. Para ello se analizaron los genes que contienen un dominio conservado AP2 dentro del genoma de *M. truncatula*.

En el estudio se emplearon diferentes tipos de mutantes para identificar la naturaleza de las señales inductivas y reguladoras. Los diferentes mutantes fueron: una línea con mutación en el receptor *nfp* que es insensible a los factores Nod; una línea con mutación en el receptor

LysM mínimamente sensible a los factores Nod; una línea *sickle*, un mutante hipernodulante insensible al ET; y una línea de genotipo silvestre A17.

Se observó que 216 genes de *M. truncatula* contienen el dominio AP2. De este conjunto de genes, 47 presentaron una mayor inducción y entre ellos se pudieron diferenciar dos patrones de expresión. El primero de los patrones fue el de los genes regulados de 0,5 a 3 horas tras la infección (hpi), dependientes de ET e independientes de los factores Nod. El segundo de los patrones fue el de los genes regulados sobre las 6 horas tras la infección, regulados negativamente por ET y variablemente dependientes de los factores Nod. El factor de transcripción

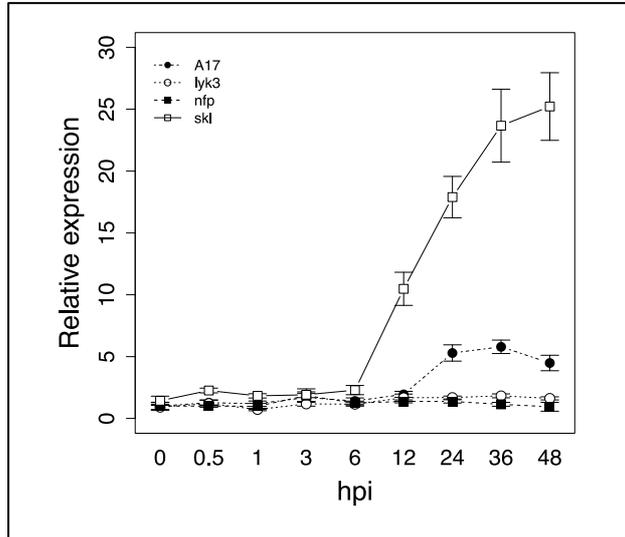


Figura 7: Patrón de expresión representativo del factor de transcripción ERF10 (Larrainzar *et al.*, 2015).

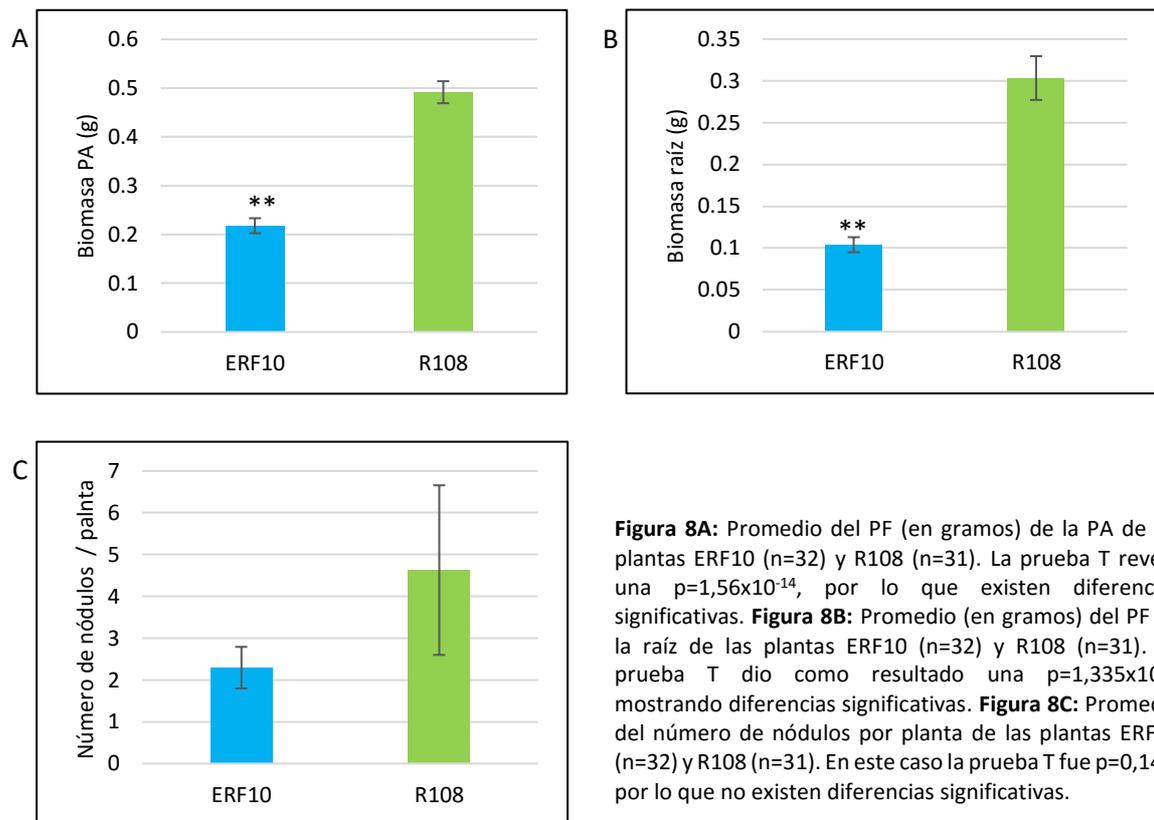
ERF10 se encuentra dentro del segundo grupo (Figura 7). En base a analogías con otros genes del grupo, probablemente, regulan las respuestas simbióticas tempranas.

Tal y como se puede observar en la Figura 7, la línea *sickle* (skl) comienza a aumentar su expresión a las 6 horas tras la infección (hpi). Sin embargo, excepto la línea A17 (la línea de genotipo silvestre) que presenta una mayor expresión transcurridas 12 horas tras la infección (aunque mucho menor que la línea *sickle*), las demás líneas estudiadas no aumentan su expresión.

3.2 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

3.2.1 Medidas de biomasa vegetal

Tras la toma de medias del material biológico pudieron observarse diferencias significativas ($p < 0,05$ en el test prueba T) tanto en la cantidad de biomasa de la PA como en la de raíz entre las plantas mutantes ERF10 y las plantas control R108 (Figura 8A y 8B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos (Figura 8C) probablemente debido al amplio rango de variación del número de nódulos de las plantas R108.



3.2.2 Observación a la lupa

Diferentes nódulos teñidos con X-Gal fueron observados a la lupa y no se apreciaron diferencias claras en cuanto al tamaño o forma exterior entre los nódulos, así como de la zona de infección (Figura 9A y 9B) de las ERF10 y de su control. Únicamente pudo apreciarse la presencia en las plantas R108 de nódulos agrupados (Figura 9D). Tampoco se vieron diferencias evidentes en los cortes realizados con cuchilla a los nódulos (Figura 9E y 9F).

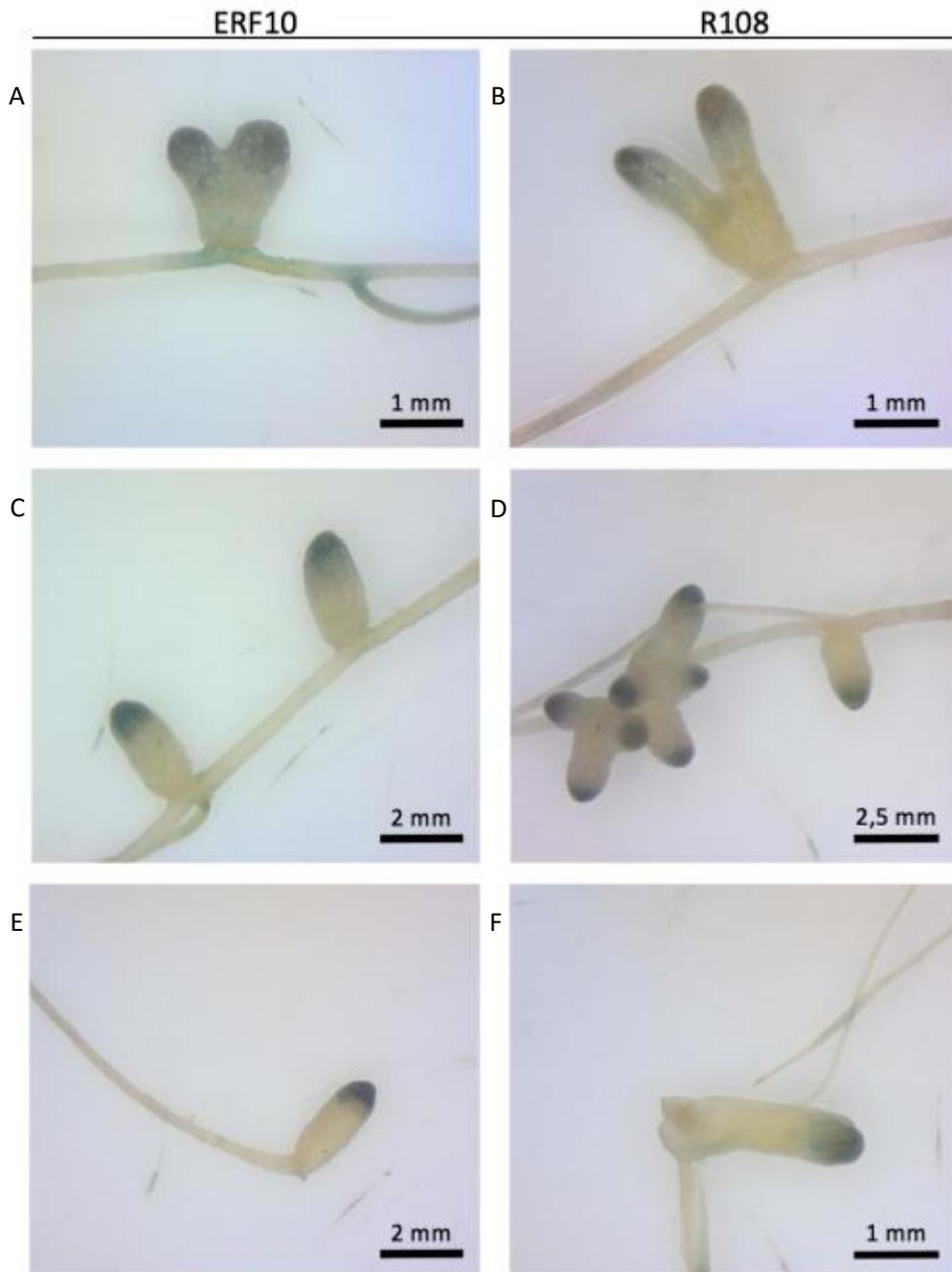


Figura 9: Comparación de los nódulos observados a la lupa de las plantas ERF10 y R108. Se puede observar en color más oscuro la infección por parte de las bacterias *S. medicae*. **Figura 9A y 9B:** Comparación de un nódulo de las plantas mutantes ERF10 y las plantas control R108. **Figura 9C y 9D:** Comparación de varios nódulos de las plantas mutantes ERF10 y las plantas control R108. **Figura 9E y 9F:** Comparación de cortes realizados con cuchilla de un nódulo individual de las plantas mutantes ERF10 y las plantas control R108.

3.2.3 Observación al microscopio óptico

Al estudiar los cordones de infección de las plantas ERF10 al microscopio óptico, se pudo apreciar la existencia de cordones aberrantes o incompletos (Figura 10A y 10B), cordones interrumpidos e inusuales en la formación de nódulos. En las muestras observadas, la

colonización no comenzaba en el ápice de los pelos radicales sino en zonas más posteriores y próximas a la raíz (Figura 10C). Por otra parte, no se llegaba a formar el bastón de pastor (Figura 10D). Sin embargo, este fenómeno no pudo observarse en las plantas R108 (datos no mostrados). De hecho, en dichas plantas, no se pudo llegar a observar ningún cordón de infección, lo que pone de manifiesto el inusual número de eventos que se pudieron apreciar en las plantas mutantes ERF10.

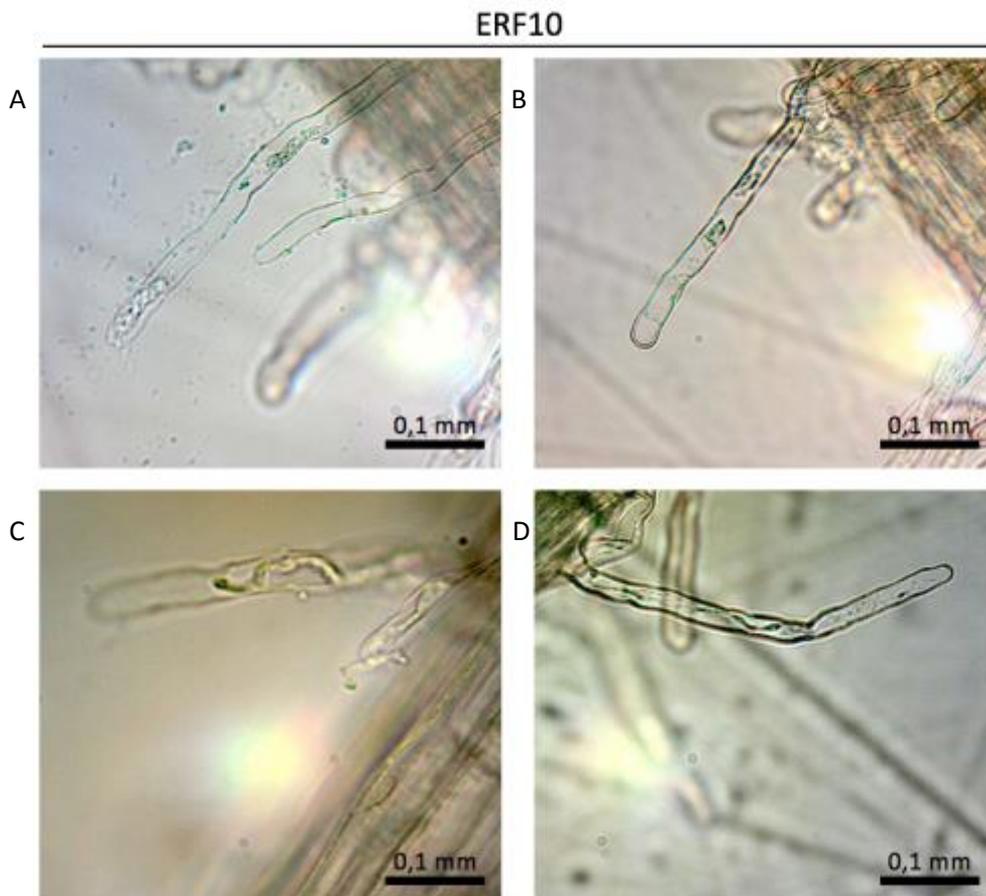


Figura 10: Imágenes de los cordones de infección observados en las plantas ERF10. En color verdoso se observan las bacterias. **Figura 10A y 10B:** Cordones de infección incompletos. **Figura 10C:** Comienzo del cordón de infección en la mitad superior del pelo radical. **Figura 10D:** El pelo radical no ha formado el bastón de pastor al ser colonizado por las bacterias.

3.2.4 Observación de los cortes de resina al microscopio óptico

Al comparar los cortes de los nódulos realizados con el microtomo de las plantas ERF10 y R108 se pudieron apreciar varias diferencias destacables:

La morfología y estructura de las células infectadas se puede observar en las imágenes obtenidas con el objetivo de 4 aumentos (Figura 11A y 11B). En la imagen de la muestra ERF10 es posible contabilizar un número mayor de células que en la imagen de la muestra R108. Por

otra parte, las células de la muestra ERF10 son más pequeñas y menos redondeadas (esta diferencia también se puede observar al comparar las imágenes 11C y 11D). Además, la zona de fijación mostrada en color azul (zona II – III) es más pequeña en la muestra ERF10 y se distribuye de forma localizada en la parte superior del nódulo.

Por otra parte, en las imágenes obtenidas con el objetivo de 10 aumentos (Figura 11C y número mayor de vacuolas en las imágenes tomadas con los objetivos de 10 y 40 aumentos en las muestras ERF10 (Figura 11C y 11E) que en las muestras de R108 (Figura 11D y 11E).

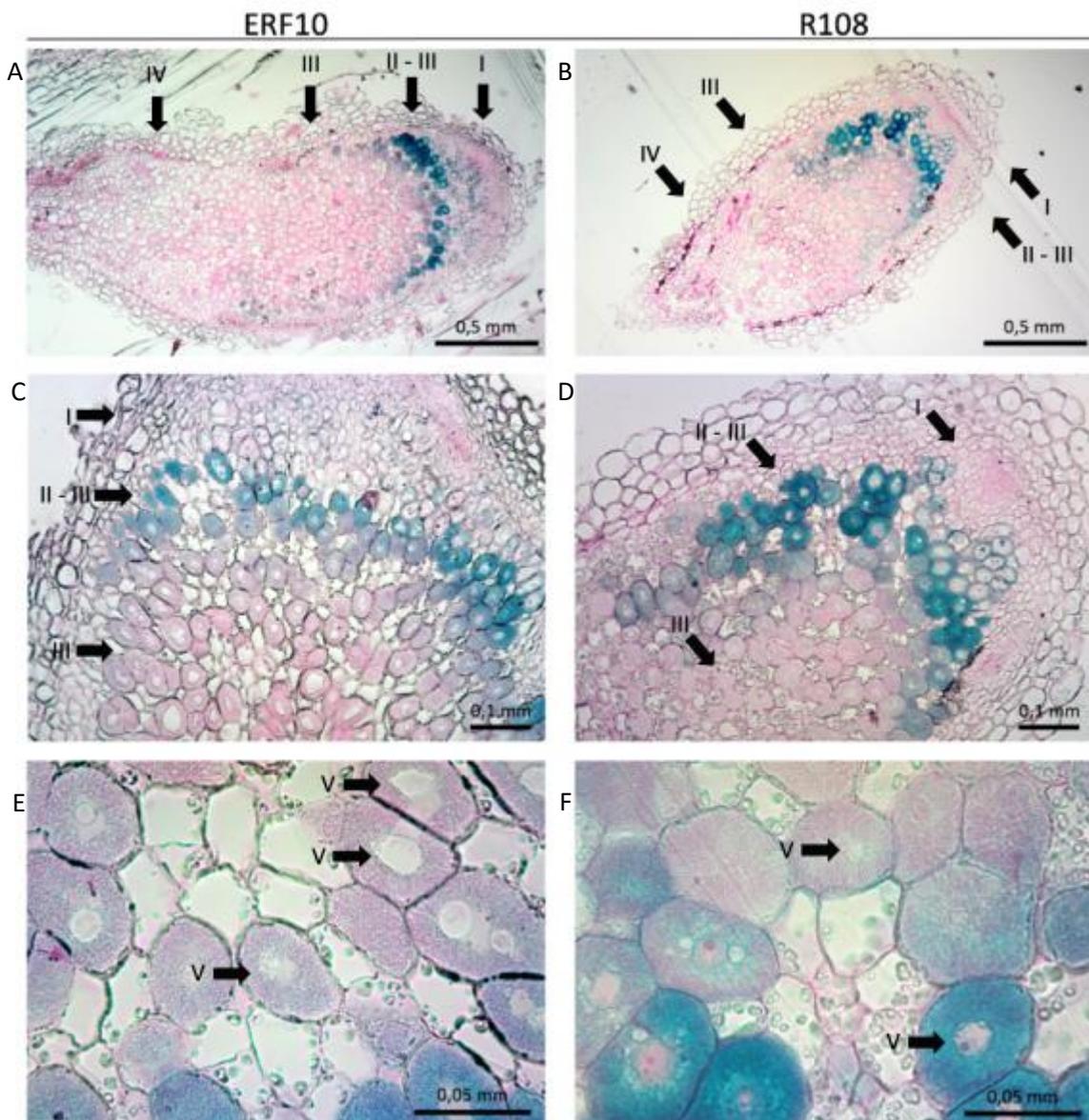


Figura 11: Imágenes de los cortes de nódulos realizados con el microtomo y teñidos con X-Gal y rojo de ruterio. **Figura 11A y 11B:** Cortes observados con el objetivo de 4 aumentos. Se han señalado con flechas las diferentes zonas del nódulo (tratadas en el punto 1.2). **Figura 11C y 11D:** Cortes observados con el objetivo de 10 aumentos. Se han señalado la zona meristemática y de infección (I), la interzona (II – III) y la zona de fijación de nitrógeno (III). **Figura 11E y 11F:** Cortes observados con el objetivo de 40 aumentos. Se han identificado mediante una V las vacuolas celulares. En color verdoso se pueden observar los gránulos de almidón.

Por último, en las imágenes tomadas con el objetivo de 40 aumentos (Figura 11D y 11E), además de las vacuolas celulares, es posible distinguir la presencia de gránulos de color verdoso identificados como gránulos de almidón. Estos gránulos son utilizados por la planta como reserva energética y están localizados en las células no infectadas. El número de gránulos de almidón es considerablemente superior en las plantas control R108 (Figura 11D y 11F) que en las plantas ERF10 (Figura 11C y 11E).

4. Discusión

4.1 Análisis molecular

Como se puede observar en la Figura 6, las muestras 1 – 4 presentan una amplificación del gen *erf10* más grande que las muestras 5 – 8, cuya amplificación se localiza alrededor de las 1100 pb (el tamaño correspondiente el gen *erf10*). Esto es debido a que las muestras ERF10 tienen insertado en el gen el transposón Tnt1 y por lo tanto la amplificación con los *primers erf10 fw* y *erf10 rev* tiene un tamaño mayor que el de la línea R108, cuyo gen no está alterado. Los resultados de la muestra 9, el control, muestran una amplificación del mismo tamaño que las de las muestras 5 – 8, lo que corrobora que se trata de genotipos silvestre. Por otra parte, la amplificación de las muestras 10 – 13 demuestran la presencia del transposón Tnt1 en la línea ERF10. Estas muestras se han amplificado usando el primer *erf10 fw* y el Tnt1 rev, por lo que, si no estuviera presente el transposón, no se habría producido amplificación tal y como ocurre en las muestras 14 – 17 que pertenecen a la línea R108.

Sin embargo, resulta llamativa la presencia de una banda de amplificación de la muestra 4 del tamaño de amplificación del gen *erf10* de las muestras R108. Por otra parte, la muestra 4 también presenta una menor amplificación (una banda más delgada) en la banda del tamaño de amplificación de *erf10* de las muestras 1 – 3. Esto puede deberse a que la muestra 4 de ERF0 no sea homocigota, como son las muestras 1 – 3 de ERF10, sino que sea heterocigota y presente el transposón únicamente en uno de los genes alelos. De este modo puede explicarse la presencia de la banda de amplificación en los 6000 pb y de la banda en los 1000 pb.

En las muestras 1, 2 y 3 se intuye una banda a la altura de las amplificaciones de las muestras 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Estas bandas se han catalogado como inespecíficas. Algo similar ocurre con las muestras 14, 15 y 16. Presentan unas ligeras bandas a la altura de las amplificaciones de las bandas 10, 11, 12 y 13 y en este caso también se han catalogado como inespecífico.

La cuantificación *in silico* de los niveles de expresión del TF ERF10 sirvió para conocer que dicho TF se expresa alrededor de las 6 horas tras la infección y además está regulado negativamente por el ET. Sin embargo, para comprobar los niveles de expresión en la línea ERF10 y hacer una comparación con la línea R108 sería de gran interés realizar una PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR). Con esta técnica se puede cuantificar el ADN que se desea amplificar a la vez que se produce la amplificación. Con la adición de un fluoróforo y gracias a un sensor de fluorescencia, es posible medir tras cada ciclo de amplificación la fluorescencia emitida tras excitar el fluoróforo a una longitud de onda determinada.

4.2 Análisis funcional de los mutantes ERF10 en la simbiosis *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium medicae*

Del análisis de la biomasa tanto de la PA como de la raíz se revelan diferencias significativas (Figura 8A y 8B). Al parecer, la mutación en el gen *erf10* está relacionado con la reducción de la biomasa de la PA, lo que podría influir en la tasa de FBN. Al proceder a la recogida del material vegetal y a la toma de medidas se dejó una semana de tiempo entre la recogida de las plantas ERF10 y las plantas R108. Durante esta semana, las plantas R108 siguieron creciendo. Para obtener una mayor fiabilidad se debería repetir la toma de medida de biomasa con plantas crecidas bajo las mismas condiciones. Es decir, plantas sembradas y cosechadas al mismo tiempo y crecidas juntas como era el caso de las plantas estudiadas.

Por otra parte, no se reflejaron diferencias significativas en el número de nódulos de ambos tipos de planta. Sin embargo, en un estudio realizado por Vernie *et al.* (2008) se comprobó que un TF de la familia de ERF10 y perteneciente al grupo V denominado EFD es necesario para la formación de nódulos. La inactivación del gen codificante del TF EFD tiene como consecuencia el bloqueo de la formación de nuevos nódulos y la activación de la diferenciación bacteriana. En los resultados obtenidos en relación con el número de nódulos, el error relativo de las plantas R108 fue muy grande (Figura 8C). Esto puede deberse al procedimiento empleado a la hora de contabilizar los nódulos de las plantas. El crecimiento de las plantas en medio aeropónico presentó como ventaja la limpieza de dichas plantas, y, consecuentemente, la ventaja a la hora de examinarlas visualmente y a la hora de conservar material vegetal limpio. No obstante, las raíces de las plantas se fueron enredando durante su crecimiento, forzando a realizar tanto la medida de biomasa de la raíz como la del número de nódulos en grupos de números de plantas variables y posteriormente haciendo una media del grupo. El crecimiento de plantas en macetas sería una buena solución al problema del muestreo de las raíces, incluyendo los nódulos, de las plantas. Con este procedimiento, las medidas de la biomasa de cada planta serían más precisas y reales. Por otra parte, al crecer las plantas en macetas también se podrían realizar mediciones de FBN y así poder confirmar si dicho proceso se ve afectado por la mutación en el gen *erf10*.

En la observación a la lupa de los nódulos enteros y de los cortes realizados con cuchilla no se pudo comparar un gran número de nódulos. Además, de cada planta se seleccionaron fragmentos de raíz al azar, unos de zonas más próximas a la PA y otros de zonas más apicales. Para poder realizar una comparación más precisa y, de este modo, confirmar los resultados obtenidos sería necesario seleccionar fragmentos homólogos de todas las plantas y las

diferencias encontradas. El crecimiento de las plantas en macetas, además de resultar útil para las medidas de biomasa y la FBN, también permitiría obtener un mayor número de nódulos para poder realizar comparaciones.

Por otra parte, al observar las muestras de raíz al microscopio óptico, se encontraron diferencias en los cordones de infección. Mientras que las plantas ERF10 presentaban un inusual número de cordones, que además eran incompletos y anormales, no se pudieron observar estos eventos infecciosos en las plantas R108. En un estudio realizado por Cerri *et al.* (2012) se propuso que TFs pertenecientes al dominio ERF están estrechamente relacionados con la formación de cordones de infección en *M. truncatula*. Al parecer, TFs pertenecientes al dominio ERF también juegan un papel determinante en el control de la infección bacteriana a través de los cordones de infección. Para poder hacer una comparación más completa y rigurosa, sería conveniente hacer crecer las plantas en placas de agar. De este modo, el tamaño de la raíz es mucho más reducido, y se puede comparar la raíz completa, cuantificar el número de eventos e incluso determinar en qué zonas de la raíz son más abundantes (Cerri *et al.*, 2017).

En los cortes realizados es posible apreciar que las plantas ERF10 presentan un mayor número de vacuolas. La modificación de las vacuolas juega un importante papel en la infección por parte de los rizobios a las leguminosas. Al parecer, el mantenimiento de los simbiosomas requiere un ajuste importante de la vía de formación de vacuolas y del tráfico dirigido a tonoplastos. Estos cambios ocurren en las zonas II y III, donde el volumen de la vacuola de la célula huésped se reduce en un 75%, y esto se acompaña de plegado de tonoplasto (Gavrin *et al.*, 2014). No obstante, en los nódulos de la línea ERF10 no se ha producido el ajuste de las vacuolas, que son de gran tamaño si se comparan con las de los nódulos de la línea R108.

En las imágenes de los cortes tomadas a 40 aumentos también puede apreciarse la presencia de gránulos de almidón (sustancias de color verdoso localizadas en el interior de las células no teñidas). Al comparar la línea ERF10 con la línea R108 se puede apreciar una mayor presencia de gránulos de almidón en la línea control. Esta diferencia en la cantidad de almidón acumulada entre ambas líneas puede deberse a la mutación en el gen *erf10*. Sin embargo, sería necesario comparar un mayor número de muestras para poder corroborarlo.

4.3 Perspectivas futuras

De los experimentos realizados se han podido extraer varias conclusiones. Pero, también ha sido posible proponer más experimentos que ayuden a corroborar y ampliar los resultados obtenidos.

Con el crecimiento en macetas de las plantas, además de obtener un mayor número de nódulos para comparar, realizar un análisis de biomasa más fiable y poder tomar medidas de FBN, se pueden realizar otras medidas interesantes. Estas medidas serían medidas fisiológicas como medidas de SPAD para cuantificar la clorofila de cada planta, medidas de almidón o medidas de actividades enzimáticas.

En la observación de los cortes realizados con el microtomo, se puede apreciar que los cortes no son limpios. Presentan arañazos e incluso roturas que impiden tomar imágenes de calidad y realizar una buena observación. Para obtener buenos cortes y corroborar las diferencias encontradas, es preciso realizarlos con una nueva cuchilla más dura y preparada para realizar cortes a la resina. La cuchilla con la que se realizaron los cortes fotografiados, es una cuchilla más débil pensada para hacer cortes a muestras embebidas en parafina, un material más maleable que las cápsulas de resina empleadas en el presente estudio. Con la obtención de cortes de calidad también se podría realizar una contabilización de los gránulos de almidón observados con los objetivos de 10 y 40 aumentos. De este modo sería posible saber si existen diferencias significativas. La tinción de cortes con lugol sería interesante para la observación del almidón. El lugol es una disolución de yodo molecular y yoduro potásico, esta disolución reacciona con el almidón tiñéndolo de color violeta.

Sería también de gran interés poder realizar todas las medidas comentadas comparando la línea ERF10, con el gen *erf10* mutado, con la línea ERF10 wild tipe-like (ERF10 wt-like). La línea ERF10 wt-like sería un control mejor que la línea R108 ya que es más próxima a la línea ERF10.

5. Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas de este estudio son:

- El TF ERF10 comienza a expresarse alrededor de las 6 horas tras la infección de forma dependiente a los factores Nod.
- El TF ERF10 está implicado crecimiento de la PA ya que al mutarlo se reduce la biomasa vegetal. Esta reducción podría deberse a una disminución de la tasa de FBN.
- El TF ERF10 parece estar implicado en la formación de los cordones de infección dando lugar a un elevado número de cordones de infección que, a la vez, eran incompletos y aberrantes.
- El TF ERF10 parece tener un papel en el ajuste de las vacuolas de las zonas II y III del nódulo.
- Alteraciones en la expresión de ERF10 provocan una reducción en la acumulación de gránulos de almidón en las células no infectadas del nódulo.

Bibliografía

- Arrese-Igor, C., González, E., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E. and Gil-Quintana, E. (2011) 'Physiological responses of legume nodules to drought', *Plant Stress*, 5, pp. 24–31.
- Arrese-Igor, C., Minchin, F. R., Gordon, A. J. and Nath, A. K. (1997) 'Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate', *Journal of Experimental Botany*, 48, pp. 905–913.
- Ausubel, F. M. (1986) 'Biological nitrogen fixation: recent advances and future prospects', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 6, pp. 1–10.
- Bailly, X., Giuntini, E., Sexton, M. C., Lower, R. P. J., Harrison, P. W., Kumar, N. and Young, J. P. W. (2011) 'Population genomics of *Sinorhizobium medicae* based on low-coverage sequencing of sympatric isolates', *The ISME Journal*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1722–1734.
- Barker, D. G., Pfaff, T., Moreau, D., Groves, E., Ruffel, S., Lepetit, M., Whitehand, S., Maillet, F., Nair, R. M. and Journet, E. (2006) 'Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions', *Medicago truncatula handbook*, pp. 1–26.
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M. and Dalton, D. A. (2010) 'Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules', *New Phytologist*, 188, pp. 960–976.
- Cerri, M. R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M., Niebel, A., Oldroyd, G. E. D., Barker, D. G., Fournier, J. and De Carvalho-Niebel, F. (2012) '*Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection', *Plant Physiology*, 160, pp. 2155–2172.
- Cerri, M. R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Downie, J. A., Klingl, A., De Carvalho-Niebel, F. and Parniske, M. (2017) 'The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*', *New Phytologist*, 215, pp. 323–337.
- Cook, D. R. (1999) '*Medicago truncatula* - a model in the making!', *Current Opinion in Plant Biology*, 2, pp. 301–304.
- Farkas, A., Marólt, G., Dürgo, H., Györgypál, Z., Lima, R. M., Medzihradsky, K. F., Kereszt, A., Mergaert, P. and Kondorosi, É. (2014) '*Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247

- contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11, pp. 5183–5188.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D. E. and Gresshoff, P. M. (2010) 'Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation', *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, pp. 61–76.
- Ferguson, B. J., Lin, M.-H. and Gresshoff, P. M. (2013) 'Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions', *Plant Signaling & Behavior*, 8, pp. 1–5.
- Fischer, H.-M. (1994) 'Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia', *Microbiological Reviews*, 58, pp. 352–386.
- Franssen, H. J., Xiao, T. T., Kulikova, O., Wan, X., Bisseling, T., Scheres, B. and Heidstra, R. (2015) 'Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem', *Development*, 142, pp. 2941–2950.
- Gavrin, A., Kaiser, B., Geiger, D., Tyerman, S., Wen, Z., Bisseling, T. and Fedorova, E. (2014) 'Adjustment of host cells for accommodation of symbiotic bacteria: vacuole defunctionalization, HOPS suppression, and TIP1g retargeting in *Medicago*', *The Plant Cell*, 26, pp. 3809–3822.
- GBIF.org *Free and Open Access to Biodiversity Data*. Available at: <http://www.gbif.org>.
- Groen, S. C. and Whiteman, N. K. (2014) 'The evolution of ethylene signaling in plant chemical ecology', *Journal of Chemical Ecology*, 40, pp. 700–716.
- Guinel, F. C. (2015) 'Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation', *Frontiers in Plant Science*, 6, pp. 1–21.
- Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D. and Young, J. P. W. (2010) 'Introducing the bacterial "chromid": not a chromosome, not a plasmid', *Cell Press*, 18, pp. 141–148.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. and Graham, C. (2009) 'How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium* - *Medicago* model', *Nature Reviews Microbiology*, 5, pp. 619–633.
- Larrainzar, E., Gil-Quintana, E., Arrese-Igor, C., González, E. M. and Marino, D. (2014) 'Split-root systems applied to the study of the legume - rhizobial symbiosis: What have we learned?', *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, pp. 1118–1124.

- Larrainzar, E., Riely, B. K., Kim, S. C., Carrasquilla-Garcia, N., Yu, H.-J., Hwang, H.-J., Oh, M., Kim, G. B., Surendrarao, A. K., Chasman, D., Siahpirani, A. F., Penmetza, R. V, Lee, G.-S., Kim, N., Roy, S., Mun, J.-H. and Cook, D. R. (2015) 'Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals', *Plant Physiology*, 169, pp. 233–265.
- Lee, K. H. and LaRue, T. A. (1992) 'Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle', *Plant Physiology*, 100, pp. 1759–1763.
- Long, S. R. (1989) '*Rhizobium* - legume nodulation: life together in the underground', *Cell*, 56, pp. 203–214.
- Mortier, V., Holsters, M. and Goormachtig, S. (2012) 'Never too many? How legumes control nodule numbers', *Plant, Cell and Environment*, 35, pp. 245–258.
- Mylona, P., Pawlowski, K. and Bisseling, T. (1995) 'Symbiotic nitrogen fixation', *The Plant Cell*, 7, pp. 869–885.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H. (2006) 'Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice', *Plant Physiology*, 140, pp. 411–432.
- Nelson, D. L. and Cox, M. L. (2014) *Lehninger: Principios de bioquímica*. 6ª edición. Barcelona: Ediciones Omega S.L.
- Nishimura, R., Ohmori, M. and Kawaguchi, M. (2002) 'The novel symbiotic phenotype of enhanced-nodulating mutant of *Lotus japonicus*: astray mutant is an early nodulating mutant with wider nodulation zone', *Plant Cell Physiology*, 43, pp. 853–859.
- Oldroyd, G. E. D., Engstrom, E. M. and Long, S. R. (2001) 'Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*', *The Plant Cell*, 13, pp. 1835–1849.
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S. and Downie, J. A. (2011) 'The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis', *Annual Review of Genetics*, 45, pp. 119–144.
- Olivares, J., Bedmar, E. J. and Sanjuán, J. (2013) 'Biological nitrogen fixation in the context of global change', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, pp. 486–494.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, G. A. (2008) *Microbiología*. 7ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.

- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S.-S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P. and Ecker, J. R. (2012) 'Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas', *Science*, 338, pp. 390–394.
- Reid, D. E., Ferguson, B. J., Hayashi, S., Lin, Y.-H. and Gresshoff, P. M. (2011) 'Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation', *Annals of Botany*, 108, pp. 789–795.
- Santi, C., Bogusz, D. and Franche, C. (2013) 'Biological nitrogen fixation in non-legume plants', *Annals of Botany*, 111, pp. 743–767.
- Shu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Song, L. and Guo, C. (2016) 'Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*', *Frontiers in Plant Science*, 6, pp. 1–17.
- Suliman, S. and Tran, L.-S. P. (2014) 'Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences*, 15, pp. 19389–19393.
- Terpolilli, J. J., Hood, G. A. and Poole, P. S. (2012) 'What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses?', *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier Ltd., 60, pp. 325–389.
- Udvardi, M. and Poole, P. S. (2013) 'Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses', *Annual Review of Plant Biology*, 64, pp. 781–805.
- Unkovich, M. (2013) 'Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation', *New Phytologist*, 198, pp. 643–646.
- Vanspronsen, P. C., Bakhuizen, R., Van Brussel, A. A. and Kijne, J. W. (1994) 'Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process', *European Journal of Cell Biology*, 64, pp. 88–94.
- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S. and Truchet, G. (1990) 'Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules', *Journal of Bacteriology*, 172, pp. 4295–4306.
- Vernie, T., Billy, D., Plet, J., Combiér, J. and Rogers, C. (2008) 'EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*', *The Plant Cell*, 20, pp. 2696–2713.

Wani, S. P., Rupela, O. P. and Lee, K. K. (1995) 'Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes', *Plant and Soil*, 174, pp. 29–49.