UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Biotecnología

Papel de COPT1, COPT2, MTP2 y ZIP6
en el transporte y la homeostasis de metales
en *Medicago truncatula*

TESIS DOCTORAL
Marta Senovilla Ramos
Licenciada en Biología
2017

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Biotecnología

Papel de COPT1, COPT2, MTP2 y ZIP6
en el transporte y la homeostasis de metales
en Medicago truncatula

TESIS DOCTORAL

Marta Senovilla Ramos

Licenciada en Biología

2017

Programa Oficial de Doctorado en Biotecnología y Recursos
Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados

Departamento de Biotecnología
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Tesis Doctoral:

"Papel de COPT1, COPT2, MTP2 y ZIP6
en el transporte y la homeostasis de metales
en Medicago truncatula"

Autor:

Marta Senovilla Ramos

Licenciada en Biología

Director:

Manuel González Guerrero

Licenciado en Bioquímica

Doctor en Bioquímica

Madrid, Julio de 2017

Lista de Reproducción para una Tesis:

First – Cold War Kids – Hold my Home
Hate to Say I Told You So – The Hives - Hate to Say I Told You So
Lonely Boy – The Black Keys – Lonely Boy
Ain't no Rest For the Wicked – Cage the Elephant - Cage the Elephant
Woman – Wolfmother – Wolfmother
Psycho – Muse - Drones
Blue Collar Jane – The Strypes – Snapshot
Bullet With Butterfly Wings – The Smashing Pumpkins – Mellon Collie and the
Infinite Sadness
Left Hand Free – alt-J – This is all Yours
Feeling Good – Muse – Origin of Symetry
Riptide – Vazquez Sounds - Riptide
Hurt – Johnny Cash – The Legend of Johnny Cash
Blue Orchid – The White Stripes – White Blood Cells
Trouble – Cage the Elephant – Trouble
Georgia – Tiggs Da Author – Georgia
Blood Pressure – Mutemath – Odd Soul
Don't Forget Who You Are – Miles Kane - Don't Forget Who You Are
Figure It Out – Royal Blood – Royal Blood
Whole Lotta Love - Led Zeppelin – Led Zeppelin II
Rose Tattoo - Dropkick Murphys – Signed and Sealed in Blood
Adelaide – The Greencards – The Brick Album
Salute your solution – The Raconteurs – Consolers of the Lonely
Por ti – Segismundo Toxicómano – Escapa!
Lemak, Aingurak – Berri Txarrak – Denbora Da Poligrafo Bakarra
El sonajero – Koma – Sakeo
Marihuana – Porretas – 12 Botellines y 5 tercios
Chanquete Ha Muerto – Mamá Ladilla – Arzobispofobia
Alosque – La Pegatina – Via Mandarina
La Torre – Talco – 10 Years
Nuvole Bianche – Ludovico Einaudi – Una mattina
River Flows In You – Yiruma – First Love
Cheek to Cheek - Ella Fitzgerald, Louis Armstrong – 100 Songs for a Centennial
Thrift Shop – Scott Bradlee's Postmodern Jukebox – Twist is the New Twerk
Coleslaw – Louis Jordan & His Tympany Five – Disc D
My Bucket's Got a Hole in It – The Blue Vipers of Brooklyn – Good Night Harry
Don't Be that Way – Teddy Wilson – Aspire
Lullaby of Birdland – Errol Gardner – The Essence of Errol Gardner

Reconocimientos:

Esta Tesis se ha realizado en el grupo de Homeostasis de Metales en las Interacciones Planta-Microorganismo, dentro del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA).

Me gustaría agradecer a mi director de Tesis, Manuel González, darme la oportunidad de hacer algo que siempre había querido, que es hacer una tesis sobre biología molecular de plantas.

Gracias a Juan Imperial, por sus aportes profesionales siempre que los he necesitado.

Gracias a cada uno de los compañeros que han formado parte de los laboratorios 271 y 281, por enseñarme los intrínquilis del laboratorio, los protocolos y como se deben operar para que sean un éxito.

Gracias a los compañeros del laboratorio 278, por ayudarnos infinitas veces con el uso del cromatógrafo.

Gracias a los compañeros del laboratorio 251, por ayudarnos en cuanto a temas de rizobios se refiere.

Este trabajo se financió por el European Research Council (ERC-2013-StG-335284).

Agradecimientos:

Quiero dar las gracias a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a que esta tesis salga adelante.

En primer lugar, a Manuel González Guerrero, por enseñarme los pros y los contras de la carrera científica, por enseñarme a defenderme no solo en el laboratorio, sino en la vida. Pero, sobre todo, gracias por ayudarme a vencer el miedo que siempre he tenido a exponer en público.

Los siguientes en la lista son todos mis compañeros del laboratorio 281 (y del 271!), que han sido como una familia todos estos años para mí: hemos compartido momentos de alegría y tristeza, estrés y no-tanto-estrés... que han contribuido a forjar una relación muy fuerte. Gracias a Rosabel, por todo el trabajo que nos ha facilitado. Gracias a los post-doc (cuyo conocimiento no siempre es limitado! XD), por su paciencia infinita: Vivi, Isidro, Manolo y Ángela, que me han ido enseñando, explicado, aconsejado y consolando cuando no me salían las cosas. Gracias infinitas a mis compañeros predoc de estos años: Rosario, Amalia, Nuria, Javi y Patri. ¡Son **tantos los momentos de confidencias, de apoyo, de solidaridad...que se podría decir** que sois uno de los motores que han impulsado esta tesis! Sois los mejores y os quiero un montón!!

Gracias a todos los laboratorios de la segunda planta, que de una manera u otra han ayudado a que hoy pueda estar depositando esta tesis.

Gracias a los compañeros del laboratorio 285, mi primer grupo de trabajo en el CBGP, **que me abrió las puertas a la Ciencia y me metió el "picorsito" de querer seguir** trabajando en ello unos años más. Gracias a los compañeros del laboratorio 285 y del B56, por hacerme sentir una más entre ellos.

Gracias a los "predoc-birrers", por esas sesiones terapéuticas al lado de una cerveza y fuera (o dentro) de estos 4 muros que componen el CBGP. Sois tantos que no os puedo nombrar sin dejarme a alguien, pero vosotros sabeis quienes sois (guiño, guiño!) y lo mucho que sus-aprecio.

En especial, gracias a Bea, por acogernos cuando llegamos a Aluche, por tantos **momentos juntas... Eres un sol!!**

También gracias a Ana por su terapia-autobusera mientras sobrevivimos al Patapalo-style-of-driving, y por los momentazos de marujas. Recuerda que vales un montón!

Fuera del CBGP, quería agradecer a los Baratheons, que aunque a cada uno la vida nos ha llevado por un camino, seguimos contando los unos con los otros, y es de agradecer.

A mis chicas de Cuéllar, mis verdaderas confidentes. Llevamos tantos años juntas y aún así, nos queremos! Gracias por todos los momentos de desconexión en viajes y salidas, por escucharme y aconsejarme.

En especial, gracias a Cris Muñoz, que me ha hecho sentir valorada todo este tiempo, y eso es mucho pedir para alguien con la tesis!

También mil gracias a Cris Barrio, que, a pesar de la distancia, me encanta hablar con ella durante horas y sentir que alguien me comprende.

Gracias a mi hermano, que me ha apoyado siempre. Me alegro mucho de que podamos hacer tantas cosas juntos: desde dar un paseo a hacer cervezas, o irnos de hermanos-viajeros. Sabes que te quiero infinita e incondicionalmente.

Gracias a mis padres, que siempre me han inculcado que "siempre debo tener metas que perseguir", y que "si se quiere, se puede":

- A mi madre, por recordarme lo valiosas que somos las mujeres. Por decirme una y mil veces que puedo con todo y demostrarme su amor de madre. Me encantan nuestras charlas post-cena.
- A mi padre, por sus consejos tan valiosos que me ha ido dando todos estos años, y que me han resuelto más de un problema. Gracias por sacarme de la rutina al campo los fines de semana: me encanta poder conversar entre los dos, creo que nos entendemos muy bien y valoro un montón esos momentos. Gracias por estar siempre dispuesto a echarme un cable, sin importar nada más: siempre dejas todo por ayudarnos.

Y aunque sea muy gruñona, os quiero muchísimo a los dos, no podría tener mejores padres!!!

Y finalmente, al que ha sido mi pilar todos estos años. Alex, gracias por compartir mi día a día. Hemos vivido de todo juntos, y has conseguido que los momentos buenos fueran mejores; los malos, menos malos. Me has demostrado que contigo puedo ser mejor persona, que podemos conseguir todo mientras estemos juntos. Ailoviu-tudemun-anbac!

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	4
ABREVIATURAS	7
RESUMEN Y ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	14
1. Transporte de zinc y cobre en plantas	18
1.1. Transporte a través de la epidermis	18
1.1.1. Transporte a través del cilindro vascular (a larga distancia)	21
1.1.2. Distribución intracelular de metales	26
1.2. Captación de metales en plantas micorrizadas	30
2. Nódulos radicales.....	32
2.1. Desarrollo del nódulo.....	32
2.2. Fijación simbiótica de nitrógeno.....	34
OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. Material Biológico y condiciones de crecimiento.	48
1.1. <i>Medicago truncatula</i>	48
1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
1.4. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	49
1.5. <i>Escherichia coli</i>	50
1.6. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	50
1.7. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
1.8. <i>Rhizophagus irregularis</i>	51
2. Medios de cultivo y solución de riego.	51
2.1. Medios y soluciones de plantas.	51
2.1.1. Medio Fahreaus.....	51
2.1.2. Solución Jenner	51
2.2. Medios y soluciones de levaduras	51
2.2.1. Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)	51
2.2.2. Synthetic Dextrose (SD)	52
2.2.3. Yeast extract-Peptone-Ethanol-Glycerol (YPEG)	52
2.3. Medios y soluciones de bacteria	52
2.3.1 Tryptone Yeast (TY).....	52
2.3.2. Yeast Mannitol Broth (YMB)	52
2.3.3. Luria-Bertani (LB)	53
2.3.4. SOC.....	53
2.3.5. SOB.....	53
2.3.6. TB.....	54
3. Purificaciones de ácidos nucleicos.....	54
3.1. Extracción de ADN genómico para genotipado de <i>M. truncatula</i>	54
3.2. Extracción de ADN genómico de plantas.....	54
3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias	55
3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras	56
3.5. Extracción de ARN de plantas.....	56
3.6. Electroforesis no desnaturizante de ácidos nucleicos	57

3.7. Electroforesis desnaturalizante de ácidos nucleicos	58
3.8. Recuperación de ADN de geles de agarosa.....	58
4. Síntesis de ADN complementario	58
5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	58
5.1. PCR no cuantitativa	59
5.1.1. PCR no cuantitativa para clonaje.....	59
5.1.2. PCR no cuantitativa para comprobación de fragmentos	59
5.2. PCR cuantitativa en tiempo real	60
6. Clonación.....	61
6.1 Vectores usados	61
6.2. Clonación Gateway	62
6.3. Clonación mediante enzimas de restricción.....	63
6.4. Clonación por recombinación homóloga.....	63
7. Transformación	63
7.1. Transformación de <i>E. coli</i>	63
7.1.1. Transformación química	63
7.1.2. Electrotransformación	64
7.2. Transformación de <i>Agrobacterium</i>	65
7.2.1. Preparación de electrocompetentes.....	65
7.2.2. Transformación	65
7.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	65
7.4. Transformación de <i>M. truncatula</i>	66
7.5. Transformación de <i>N. benthamiana</i>	66
8. Visualización de micorrizas arbusculares.....	67
9. Visualización de actividad β-glucoronidasa (GUS)	67
10. Inmunolocalización	68
11. Determinación del contenido de metales.....	69
12. Localización de la distribución de metales.....	70
12.1. Localización de la distribución de hierro.....	70
12.3. Localización de la distribución de cobre.....	71
13. Medida de actividad nitrogenasa	71
14. Actividad citocromo oxidasa	71
15. Extracción de proteínas.....	72
16. Determinación de proteínas	72
17. Western blot	73
17.1. Electroforesis de proteínas y tinción del gel.	73
17.2. Electro transferencia de proteínas	73
17.3. Immunodetección de proteínas.....	74
18. Bioinformática.....	74
18.1. Comparación de secuencias.....	74
18.2. Diseño oligonucleótidos	78
RESULTADOS.....	82
MtCOPT1	84
MtCOPT1 es específico de nódulo.....	88
MtCOPT1 transporta cobre hacia el citoplasma	91
MtCOPT1 se expresa a lo largo de las zonas de diferenciación y fijación de los nódulos	92
La proteína MtCOPT1 se localiza en la membrana plasmática de células infectadas y no infectadas de las zonas de diferenciación- fijación del nódulo.....	94

La mutación de <i>MtCOPT1</i> afecta a la capacidad de fijar nitrógeno en la simbiosis con <i>S. meliloti</i>	96
El fenotipo de <i>copt1-1</i> se debe a un menor aporte de cobre para la fijación simbiótica de nitrógeno	101
MtCOPT2	108
<i>MtCOPT2</i> se expresa en raíces micorrizadas.....	110
<i>MtCOPT2</i> se localiza en células con arbúsculos	110
<i>MtCOPT2</i> transporta cobre hacia el citosol	113
MtZIP6	118
<i>MtZIP6</i> se expresa en nódulos	120
<i>MtZIP6</i> se localiza en la membrana plasmática de células de la zona de infección-diferenciación del nódulo.....	122
El silenciamiento de <i>MtZIP6</i> tiene un efecto negativo en la fijación de nitrógeno	126
<i>MtZIP</i> aporta zinc a las células infectadas	130
MtMTP2.....	140
<i>MtMTP2</i> se expresa en nódulos de <i>M. truncatula</i>	142
<i>MtMTP2</i> interviene en la extrusión de zinc desde el citoplasma	144
<i>MtMTP2</i> se localiza en las zonas de diferenciación-fijación.....	146
<i>MtMTP2</i> se requiere para una correcta fijación de nitrógeno.....	150
DISCUSIÓN	154
CONCLUSIONES	166
BIBLIOGRAFÍA.....	172
ANEXOS	194
Anexo I: Oligonucleótidos usados durante esta tesis.....	194
Anexo II: Controles de Confocal	197
Anexo III: Comparativa del promotor de <i>MtCOPT2</i> para R108 y A17	199

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Índice de Figuras

Figura 1: Concentración de zinc y cobre en suelos de Europa	15
Figura 2: Transporte de zinc, hierro y cobre en la epidermis de la raíz de la dicotiledónea modelo <i>A. thaliana</i>	18
Figura 3: Topología de un transportador de la familia ZIP tipo.....	19
Figura 4: Topología de un transportador tipo de la familia COPT.....	20
Figura 5: Transporte a través del xilema y floema	21
Figura 6: Topología de un transportador ATPasa tipo P _{1b}	22
Figura 7: Topología y sustratos de un transportador YSL tipo.....	25
Figura 8: Topología y sustratos metálicos de un transportador MTP tipo.	28
Figura 9: Transporte de metales por vía indirecta.....	30
Figura 10: Desarrollo de un nódulo radicular	33
Figura 11: Transporte de metales en el nódulo.	37
Figura 12: <i>MtCOPT1</i> es un miembro de la familia COPT.....	87
Figura 13: Expresión en partes aéreas, raíces y nódulos de los miembros de la familia COPT de <i>M. truncatula</i>	89
Figura 14: <i>MtCOPT1</i> transporta cobre hacia el citosol.....	90
Figura 15: <i>MtCOPT1</i> se expresa en las zonas de diferenciación y fijación del nódulo	92
Figura 16: Localización tisular de la expresión de <i>MtCOPT1</i>	93
Figura 17: Localización subcelular de <i>MtCOPT1</i>	95
Figura 18: Fenotipo resultante de la mutación de <i>MtCOPT1</i>	96
Figura 19: Expresión de los miembros de la familia COPT en nódulos de <i>M. truncatula</i> control y mutante <i>copt1-1</i>	97
Figura 20: Fenotipo de <i>copt1-1</i> en plantas fertilizadas con nitrógeno	98
Figura 21: Contenido en cobre de parte aérea, raíz y nódulos de plantas control, <i>copt1-1</i> , y <i>copt1-1</i> transformado con <i>MtCOPT1</i>	98
Figura 22: Efecto de la mutación en <i>MtCOPT1</i> sobre la distribución de cobre.....	99
Figura 23: Complementación por cobre del fenotipo de <i>copt1-1</i>	102
Figura 24: Expresión de los genes de citocromo oxidasa de <i>S. meliloti</i>	103
Figura 25: Expresión de la familia COPT de <i>M. truncatula</i> en raíz no micorrizada (RNM) frente a muestras de raíz micorrizada (RM)	110
Figura 26: Localización de <i>MtCOPT2</i>	112
Figura 27: Determinación del sustrato transportado por <i>MtCOPT2</i>	113
Figura 28: Expresión de <i>MtZIP6</i> y relación con otros miembros de la familia ZIP.	120
Figura 29: Expresión tisular de <i>MtZIP6</i>	123
Figura 30: El epítipo HA no afecta a la funcionalidad de <i>MtZIP6</i>	124
Figura 31: Localización subcelular de <i>MtZIP6</i> -HA.....	125
Figura 32: Expresión heteróloga de <i>MtZIP6</i> en <i>N. benthamiana</i>	126
Figura 33: Fenotipo de plantas silenciadas en <i>MtZIP6</i> crecidas bajo aporte externo de nitrato amónico.....	127
Figura 34: Fenotipo en condiciones simbióticas de plantas silenciadas en <i>MtZIP6</i>	128
Figura 35: Inmunodetección de la proteína nifH en extracto proteico crudo de nódulos controles o silenciados en <i>MtZIP6</i>	129
Figura 36: Expresión de miembros de la familia ZIP en plantas silenciadas en el gen <i>MtZIP6</i>	129
Figura 37: Contenido de hierro y zinc en plantas controles y silenciadas en <i>MtZIP6</i>	129
Figura 38: Efecto del silenciamiento de <i>MtZIP6</i> en la homeostasis de hierro	130
Figura 39: Distribución de zinc en nódulos	131
Figura 40: Fenotipo ante exceso de zinc de plantas silenciadas en <i>MtZIP6</i>	132

Figura 41: Fenotipo ante deficiencia de zinc de plantas silenciadas en <i>MtZIP6</i> ...	133
Figura 42: Diversidad de transportadores MTP en <i>M. truncatula</i> y expresión de <i>MtMTP2</i>	143
Figura 43: Determinación del sustrato de MtMTP2 en <i>levadura</i>	144
Figura 44: Expresión tisular de <i>MtMTP2</i> en raíz y nódulo	146
Figura 45: Localización tisular de la expresión de <i>MtMTP2</i>	147
Figura 46: Localización de MtMTP2 en nódulo	148
Figura 47: Sección transversal de raíz transformada con MtMTP2-HA.....	149
Figura 48: Fenotipo de mutantes en MtMTP2 en simbiosis	150
Figura 49: Fenotipo de <i>mtp2-1</i> y <i>mtp2-2</i> en condiciones no simbióticas	151

Índice de Tablas

Tabla 1: Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	49
Tabla 2: Cepas de <i>S. meliloti</i>	50
Tabla 3: concentraciones de los reactivos de PCR empleados.	59
Tabla 4: Condiciones estándar de PCR utilizadas.	59
Tabla 5: concentraciones de los reactivos de PCR empleados.	60
Tabla 6: Condiciones estándar de PCR utilizadas.	60
Tabla 7: Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas.....	61
Tabla 8: Vectores usados en esta tesis.	61
Tabla 9: Reacciones de ligación Gateway	62
Tabla 10: Restricción de fragmentos de DNA	63

ABREVIATURAS

ABC	Del inglés " <u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette"
Ac	Anticuerpo, véase también Ig
ADP	Del inglés " <u>a</u> denosine <u>d</u> iphosphate"
AMF	Del inglés " <u>A</u> rbuscular <u>M</u> icorrhizal <u>E</u> ungi"
Amp	Ampicilina
ATP	Del inglés " <u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate"
ATX1	Del inglés " <u>a</u> ntioxidant protein"
BAS	Del inglés " <u>B</u> ranch <u>e</u> d <u>a</u> bsorbing <u>s</u> tructures"
BCA	Del inglés " <u>b</u> icinchoninic acid"
BSA	Del inglés " <u>B</u> ovine serum albumin"
bv	Biovar
CDF	Del inglés " <u>C</u> ation <u>D</u> iffusion <u>E</u> acilitator", véase también MTP
cDNA	Del inglés " <u>c</u> omplementary <u>D</u> NA"
CFP	Del inglés " <u>c</u> yan fluorescent protein"
COPT	Del inglés " <u>C</u> opper <u>T</u> ransporter", véase también CTR
COX	Citocromo <u>o</u> xidasa
CS1	Del inglés " <u>C</u> opper-sensor 1"
CTAB	Del inglés " <u>C</u> etyl <u>t</u> rimethylammonium <u>b</u> romide"
CTR	Del inglés " <u>C</u> opper <u>T</u> ransporter", véase también COPT
DAPI	Del inglés " <u>4</u> ', <u>6</u> - <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol"
DMA	Del inglés " <u>2</u> '- <u>d</u> eoxymugineic <u>a</u> cid"
DMI	Del inglés " <u>D</u> oes not <u>m</u> ake <u>i</u> nfections"
DMT1	Del inglés " <u>D</u> rug/ <u>M</u> etabolite <u>t</u> ransporter"
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Del inglés " <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid"
dNTPs	Del inglés " <u>d</u> eoxynucleotide triphosphates"
EDTA	Del inglés " <u>e</u> thylenediaminetetra <u>a</u> cetic acid"
epiHMA	Ácido 3-epihidroximugeínico
epiHDMA	Ácido 3-epihidroxi-2'-desoximugeínico
ERM	Del inglés " <u>e</u> xtra- <u>r</u> adical <u>m</u> ycelium"
ERN	Del inglés " <u>e</u> thylene <u>r</u> esponse factor required for <u>n</u> odulation"
ETR	Del inglés " <u>e</u> thylene <u>r</u> eceptor"
FAD	Flavín Adenosín Dinucleótido
NF	<u>F</u> actores <u>N</u> od, o factores de nodulación
FPN	Ferroportina
FRD	Del inglés " <u>f</u> erric <u>r</u> eductase <u>d</u> efective"

FRO	Del inglés " <i>ferric-chelate reductase oxidase</i> "
FSN	Eijación Simbiótica de Nitrógeno
gDNA	Del inglés " <i>genomic DNA</i> "
GFP	Del inglés " <i>green fluorescent protein</i> "
Gm	Gentamicina
HCC	Del inglés " <i>Homologous of Chaperone SCO</i> "
His	Histidina
HMA	Del inglés " <i>Heavy metal P-type ATPase</i> "
ICP-MS	Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente
Ig	Inmunoglobulina, véase Ac
IPD	Del inglés " <i>transcription factor interaction protein of DMI3</i> "
IRM	Del inglés " <i>intra-radical mycelium</i> "
IRT	Del inglés " <i>iron regulated transporter</i> "
Km	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
LCOs	Del inglés " <i>lipo-chitin oligosaccharides</i> "
MA	Micorrizas Arbusculares
MATE	Del inglés " <i>multi-antimicrobial extrusion protein</i> "
MES	Del inglés " <i>2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid</i> "
miRNA	microRNA
MOPS	Del inglés " <i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i> "
MTP	Del inglés " <i>metal transporter protein</i> " véase también CDF
NA	Nicotianamina
NADP	Del inglés " <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> "
NADPH	Del inglés " <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate H⁺-reduced</i> "
NAS	Del inglés " <i>nicotianamine synthetase</i> "
NIN	Del inglés " <i>nodule inception protein</i> "
Nramp	Del inglés " <i>natural resistance-associated macrophage protein</i> "
OD	Densidad óptica
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
OPT	Del inglés " <i>oligopeptide transporter</i> "
PAA	Del inglés " <i>P-type ATPase of Arabidopsis</i> "
PBS	Del inglés " <i>Phosphate-buffered saline</i> "
PCH1	Del inglés " <i>plastid chaperone 1</i> "
PCR	Del inglés " <i>polymerase chain reaction</i> "
PEG	Polietilen-glicol
Pi	Del inglés " <i>inorganic phosphate</i> "
PFA	Del inglés " <i>para-formaldehyde</i> "

PMSF	Fluoruro de Metilfenilsulfonilo
PPA	Del inglés " <i>Prepenetration apparatus</i> "
PVPP	Poli-vinil poli-pirrolidona
p/v	peso/volumen
qRT-PCR	Del inglés " <i>quantitative real time PCR</i> "
RAN1	Del inglés " <i>responsive to antagonist 1</i> "
RE	Retículo endoplásmico
Rf	Rifampicina
RM	Raíz micorrizada
RNA	Del inglés " <i>ribonucleic acid</i> "
RNAi	RNA de interferencia
RNM	Raíz no micorrizada
ROS	Del inglés " <i>reactive oxygen species</i> "
SD	Del inglés " <i>synthetic defined medium</i> "
SDS	Del inglés " <i>sodium dodecyl sulphate</i> "
SDS-PAGE	Del inglés " <i>sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel</i> "
SOB	Del inglés " <i>super optimal broth</i> "
SOC	Del inglés " <i>super optimal broth with catabolite repression</i> "
SOD	Del inglés " <i>superoxide dismutase</i> "
Str	Estreptomicina
S-XRF	Del inglés " <i>synchrotron X-ray fluorescence</i> "
TB	Del inglés " <i>Terrific Broth</i> "
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TMD	Del inglés " <i>transmembrane domain</i> "
TMPD	Del inglés " <i>N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylenediamine</i> "
TPBS	Tween con PBS
TSC	Ruta de transducción de señal común
TY	Del inglés " <i>triptone yeast</i> "
TXRF	Del inglés " <i>total X-ray fluorescence</i> "
v/v	volumen/volumen
WGA	Del inglés " <i>Wheat Germ Agglutinin</i> "
WT	Del inglés " <i>wild type</i> "
YMB	Del inglés " <i>yeast mannitol broth</i> "
YPD	Del inglés " <i>yeast extract peptone dextrose</i> "
YPEG	Del inglés " <i>yeast extract peptone ethanol glycerol</i> "
YSL	Del inglés " <i>Yellow Stripe-like transporter</i> "
ZIF	Del inglés " <i>Zinc induced facilitator</i> "

ZIP

Del inglés "Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like
Protein"

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

El cobre y el zinc son cofactores esenciales de enzimas involucradas en múltiples procesos fisiológicos (Finkelstein, 2009). En plantas participan, entre otros procesos, en la fotosíntesis (Yruela, 2013), en la respiración oxidativa (Ravet & Pilon, 2013), la floración (Takahashi *et al.*, 2003), y, en el caso de las leguminosas, en la fijación simbiótica de nitrógeno (Brear *et al.*, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2016). Dada su importancia como nutrientes, se ha realizado un importante esfuerzo para entender cómo las plantas distribuyen y usan estos oligonutrientes metálicos. Sin embargo, este trabajo ha sido principalmente realizado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Peñarrubia *et al.*, 2015; Brumbarova *et al.*, 2015) y en cereales (Nozoye *et al.*, 2011; von Wirén *et al.*, 1994). Por ello, mucho menos se conoce sobre cómo estos metales son transferidos por las leguminosas a sus nódulos radicales. En la presente Tesis Doctoral, hemos estudiado dos transportadores involucrados en el suministro de zinc para la fijación simbiótica de nitrógeno, y uno involucrado en la incorporación de cobre. Además, trabajando en este último, se ha identificado a un homólogo cercano que podría estar involucrado en la captación de cobre de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

ABSTRACT

Copper and zinc are essential cofactors of enzymes involved in multiple physiological processes (Finkelstein, 2009). In plants, they participate in photosynthesis (Yruela, 2013), oxidative respiration (Ravet & Pilon, 2013), flowering (Takahashi *et al.*, 2003), and, in the case of legumes, in symbiotic nitrogen fixation (Brear *et al.*, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2016), among others. Given their importance as nutrients, a significant effort has been invested in understanding how plants distribute and used these essential metallic oligonutrients. However, this work has been mainly done in model plant *Arabidopsis thaliana* (Peñarrubia *et al.*, 2015; Brumbarova *et al.*, 2015) and in cereals (Nozoye *et al.*, 2011; von Wirén *et al.*, 1994). Consequently, much less is known on how these metals are delivered by the legumes to their root nodules. In this PhD thesis, we have studied two transporters involved in zinc delivery for symbiotic nitrogen fixation, and one involved in copper uptake. In addition, while working on the later, we have also identified a close homologue putatively involved in copper uptake form arbuscular mycorrhizal fungi.

INTRODUCCIÓN

Zinc y cobre son dos metales de transición¹ esenciales para la vida. Después del hierro, el zinc es el segundo más abundante en los seres vivos (Alloway, 2009). A diferencia de hierro y cobre, este metal no experimenta cambios oxidativos en condiciones fisiológicas, por lo que no participa en reacciones de transferencia de electrones. En general, coordinado tetragonalmente por N, O, o S, la mayor parte del zinc en la célula forma parte de moléculas relacionadas con la replicación y la **regulación génica, formando parte de dominios “dedos de zinc”** (Broadley *et al.*, 2007; Hänsch & Mendel, 2009; Vallee & Auld, 1990). El zinc también es cofactor de enzimas de tipo oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Sousa *et al.*, 2007).

Por sus características fisicoquímicas, al igual que ocurre con el hierro, el cobre suele actuar como cofactor redox en más de 100 metaloproteínas diferentes (Grotz & Guerinot, 2006). Las más destacables en plantas son: plastocianina, superóxido dismutasa, citocromo oxidasa y receptor de etileno (Cobine *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2001; Weigel *et al.*, 2003). También interviene en la síntesis del cofactor de molibdeno (Kuper *et al.*, 2004; Mendel & Bittner, 2006; Schwarz *et al.*, 2009).

Figura 1: Concentración de zinc y cobre en suelos de Europa. Extraídos del proyecto GEMAS (Albanese *et al.*, 2015).

Pese a la importancia de estos metales y su relativa abundancia en la corteza terrestre, con frecuencia se encuentra unido con alta afinidad a partículas del suelo, lo que reduce sustancialmente su biodisponibilidad (Alloway, 2013). Esto es

¹ Para facilitar la lectura, en esta tesis doctoral con el término metales nos referiremos específicamente a metales de transición.

especialmente extendido en el caso de zinc (Alloway, 2009; Hacısalihoglu & Kochian, 2003), que afecta a algunas de las principales áreas agrícolas de Europa (Figura 1). Esto resulta en deficiencias de zinc en la planta que se manifiesta en forma de plantas de pequeño tamaño, y reducido tamaño foliar (Alloway, 2009). Asimismo, también resulta en frutos con menor contenido de zinc, lo que conlleva que la deficiencia de zinc en la dieta sea una de las tres principales causas de malnutrición en el mundo (las otras dos son deficiencia de hierro y de vitamina A) (Mertz, 2012; Sommer, 2001). En el caso del cobre, la deficiencia del mismo en Europa no está tan extendida (Figura 1); (Russell, 2002) pero cuando se presenta, se manifiesta como manchas cloróticas en la punta y márgenes de hojas jóvenes. Si la deficiencia es severa, la hoja acaba necrosándose debido a una lignificación deficiente, causada por el descenso de la actividad de las enzimas diamino oxidasas y polifenol oxidasas (Marschner, 2011).

Esta baja biodisponibilidad de metales en suelos agrícolas conlleva una reducción en la productividad de estos cultivos que, junto a su menor calidad nutricional, supone un importante problema global. En el contexto actual de crecimiento de la población, estimada actualmente en $7,3 \cdot 10^9$ habitantes (United Nations, 2010), y el consecuente requerimiento de más alimentos con mejores propiedades nutricionales (Godfray *et al.*, 2010; White & Broadley, 2009) se debe potenciar la captación y uso de estos metales por parte de la planta. Si bien se pueden fertilizar con zinc o cobre a las plantas cuando crecen en suelos deficientes en estos metales, estos fertilizantes se lavan con facilidad y tienen un coste relativamente alto (Havlin *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Como alternativa, se ha realizado un importante trabajo para desarrollar variedades con mejor capacidad de movilizar nutrientes metálicos esenciales (Bouis & Welch, 2010; White & Broadley, 2009), definiéndose, como se verá a continuación, las bases moleculares de homeostasis de zinc y cobre en plantas. Sin embargo, estos estudios se han centrado en brassicáceas (Becher *et al.*, 2004; Deinlein *et al.*, 2012; Shanmugam *et al.*, 2011) y en monocotiledóneas (Masuda *et al.*, 2012; Wirth *et al.*, 2009), dejando de lado otros cultivos de alto interés económico y social, como las leguminosas.

Las leguminosas, a diferencia de la mayoría de las plantas, poseen sumideros adicionales de metales, los nódulos radicales. En ellos se establece una endosimbiosis que permite fijar nitrógeno atmosférico y transferirlo a la planta hospedadora. Su importancia en ecosistemas naturales está marcada por la capacidad de colonizar suelos pobres en nitrógeno que confiere a las leguminosas, y por su importancia en el ciclo del nitrógeno (Bouwman *et al.*, 2013; Sutton *et al.*, 2011). En agrosistemas, ha sido un elemento esencial de todas las prácticas de rotación de cultivos y en muchas estrategias de agricultura sostenible (Considine *et al.*, 2017). Esto es porque

permite minimizar el uso de fertilizantes nitrogenados que requieren de fuentes no renovables para su producción a gran escala (Bouwman *et al.*, 2013; Havlin *et al.*, 2005), son prohibitivamente caros en muchas zonas del mundo, y cuya síntesis y sobreuso causan una importante contaminación en la biosfera (Singh *et al.*, 2010). Esta fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) requiere de un elevado aporte de metales de transición por parte de la planta hospedadora (González-Guerrero *et al.*, 2014). No obstante, éste es un aspecto poco estudiado de la homeostasis de metales en plantas.

Por ello, en esta Tesis Doctoral nos centraremos en cómo zinc y cobre se entregan desde la planta hospedadora a los rizobios endosimbióticos en los nódulos de la leguminosa modelo *Medicago truncatula*. Para ello, primero introduciremos los procesos generales de transporte de metales en dicotiledóneas, para posteriormente centrarnos en la FSN.

1. Transporte de zinc y cobre en plantas

1.1. Transporte a través de la epidermis

La nutrición mineral en plantas comienza con la incorporación de los metales y otros nutrientes desde el suelo a la planta (Marschner, 2011). La abundancia y la disponibilidad de metales en el suelo son dos factores determinantes en la nutrición de las mismas. Suelen encontrarse en formas insolubles, adsorbidos a carbonatos, arcillas, materia orgánica o hidróxidos (Palmer & Guerinot, 2009). Esta limitación se agrava en suelos alcalinos, que componen el 30% de la corteza terrestre (Alloway, 2013). Para movilizar estos nutrientes la planta emplea bombas de H^+ para acidificar el suelo a su alrededor y así facilitar la captación del sustrato (Figura 2). Estas bombas suelen ser P-ATPasas como AHA2 el caso de *Arabidopsis thaliana* (Santi & Schmidt, 2009). En ocasiones esta función puede ir ayudada por la secreción de quelantes que sean capaces de unir metal. Al igual que ocurre con el hierro, fenoles, cumarinas, o flavinas secretadas por la raíz podrían jugar un papel en la captación de zinc o cobre desde el suelo (Clemens & Weber, 2016; Rodríguez-Celma *et al.*, 2013; Schmid *et al.*, 2014; Siso-Terraza *et al.*, 2016). Asimismo, cuando el sustrato a transportar involucra metales que pueden cambiar de estado de oxidación en condiciones fisiológicas (hierro o cobre), previo a su transporte se emplea una oxidoreductasa de la familia FRO (ferroreductasa); (Jain *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2006). Estas enzimas son de la familia de los flavocitocromos, compartiendo un dominio de unión NADPH, un dominio de unión a FAD y un dominio oxidoreductasa. La proteína FRO mejor estudiada es AtFRO2, que emplea estos dominios para transferir electrones desde el citosol hacia el exterior celular, para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} (Connolly *et al.*, 2003; Schagerlöff *et al.*, 2006). Sus homólogos AtFRO4 y AtFRO5

actuarían de manera redundante en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ en las células de la superficie de la raíz (Bernal *et al.*, 2012). Las plantas que emplean esta estrategia reductora se conocen como plantas de estrategia I, e incluye a todas las dicotiledóneas, entre las que se encuentran las leguminosas (Figura 2). Por el contrario, las plantas de estrategia II, monocotiledóneas en su totalidad, secretan quelantes extracelulares e incorporan el complejo metal-quelato como principal forma de metal asimilable (Inoue *et al.*, 2009; Kakei *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009; Nozoye *et al.*, 2011; von Wirén *et al.*, 1994).

Figura 2: Transporte de zinc, hierro y cobre en la epidermis de la raíz de la dicotiledónea modelo *A. thaliana*.

Finalmente, los metales deben ser incorporados al interior de las células de la epidermis de la raíz por medio de transportadores. En el caso del zinc, esta función es mediada por transportadores de la familia ZIP (Zrt1-like, Irt1-like Proteins) (Guerinot, 2000; Milner *et al.*, 2013). Los miembros de esta familia transportan cationes divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} o Ni^{2+} (Eide *et al.*, 1996; Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000). Estudios bioinformáticos predicen que las proteínas ZIP actúan como homodímeros (Figura 3), constando cada monómero de ocho dominios transmembrana (Antala *et al.*, 2015). La especificidad de sustrato viene dada por un dominio citosólico conservado rico en histidinas (Antala *et al.*, 2015; Nishida *et al.*, 2008; Potocki *et al.*, 2013). El primer miembro en ser descubierto en plantas fue

IRT1 en *A. thaliana* (Eide *et al.*, 1996). AtIRT1 transporta Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999). Los mutantes *irt* exhiben un fenotipo de deficiencia de hierro muy severo que provoca mortalidad prematura en las plántulas, y que puede ser rescatado mediante la adición externa de hierro (Henriques *et al.*, 2002; Varotto *et al.*, 2002). Se piensa que este transportador constituye también la principal entrada de zinc en la planta, ya que, ante un exceso de zinc en el suelo, se reduce el transporte de hierro como consecuencia de la competencia por un mismo transportador (Fukao *et al.*, 2011; Shanmugam *et al.*, 2011).

Figura 3: Topología de un transportador de la familia ZIP tipo.

A diferencia de hierro y zinc, la principal vía de entrada de Cu^+ en la planta es a través de transportadores de la familia COPT/Ctr (Kampfenkel *et al.*, 1995). Las proteínas CTR/COPT (de "Copper Transporter") son específicas de eucariotas (Sancenón *et al.*, 2003). Las COPT participan en la importación de cobre hacia el citoplasma en plantas mientras que sus homólogos CTR hacen lo propio en levadura y animales (Dancis *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2002; Sancenón *et al.*, 2003). Son proteínas con tres dominios transmembrana cuyo extremo amino se localiza en el espacio extracelular o en el lumen del orgánulo (Klomp *et al.*, 2003; Puig *et al.*, 2002) (Figura 4). El extremo amino terminal contiene un motivo rico en metioninas conservado e importante para el transporte de cobre (Puig *et al.*, 2002). También poseen un dominio conservado MxxxM en el TM2, que interviene en la adquisición del metal y probablemente media su coordinación durante el transporte, y un dominio GxxxG en el TM3 (Puig *et al.*, 2002). Las proteínas CTR/COPT se ensamblan y funcionan como trímeros (Aller *et al.*, 2004; De Feo *et al.*, 2009; Nose *et al.*, 2006). En *A. thaliana*, AtCOPT1 y AtCOPT2 estarían implicados en la captación de cobre desde el suelo, dada su mayor expresión en el meristemo de la raíz (Sancenón *et al.*,

2004) y en las células de la región de elongación de la raíz y los pelos radiculares (Perea-García *et al.*, 2013), respectivamente. Tanto *AtCOPT1* como *AtCOPT2* presentan mayor expresión en condiciones de deficiencia de cobre (Sancenón *et al.*, 2004).

Figura 4: Topología de un transportador tipo de la familia COPT.

1.1.1. Transporte a través del cilindro vascular (a larga distancia)

Una vez los metales se introducen en la raíz, deben relocalizarse a los órganos sumideros (Taiz & Zeiger, 2009). Para su abastecimiento, los nutrientes demandados han de ser transportados a través del cilindro vascular. El movimiento de los iones desde la epidermis a la endodermis de la raíz transcurre a través de dos vías paralelas (Taiz & Zeiger, 2009):

- A. Vía apoplástica: Los iones circulan por el apoplasto (Grignon & Sentenac, 1991), constituido por el espacio entre las paredes celulares, los espacios intercelulares y el lumen de las células muertas, hasta llegar a la endodermis. En la endodermis, la libre circulación de los metales se encuentra bloqueada por la banda de Caspari, una barrera impermeable que impide la libre difusión de estos iones. Para atravesarla y pasar al interior del cilindro vascular, los iones se ven forzados a atravesar la membrana plasmática y entrar en la vía simplástica, para lo que necesitan transportadores especializados.
- B. Vía simplástica: Los iones circulan por una red citoplasmática, pasando del interior celular de unas células a otras a través de plasmodesmos. Los dos parámetros que regulan la tasa de transporte simplástico son el diámetro del plasmodesmo, y su frecuencia de aparición entre células (Burch-Smith & Zambryski, 2012). El transporte simplástico se puede

mantener hasta el periciclo (Barberon & Geldner, 2014).

Transporte a través del xilema

La banda de Caspari es una estructura altamente lignificada, localizada alrededor de las células de la endodermis, que forma un cinturón impermeable que rodea el cilindro vascular y mantiene aisladas las células del periciclo de las células del córtex de la raíz (Geldner, 2013). Esta banda actúa como una barrera selectiva de captación y difusión de nutrientes. Como consecuencia de la limitación al paso de nutrientes, éstos se ven obligados a tomar la vía simplástica en un paso mediado por transportadores específicos (Steudle & Peterson, 1998).

Figura 5: Transporte a través del xilema (panel inferior derecho) y floema (panel superior derecho).

La transferencia de metales al xilema ocurre por medio de transportadores especializados (Figura 5) (Ando *et al.*, 2013; Grotz & Guerinot, 2006). AtHMA5, perteneciente a la familia de ATPasas tipo P_{1B}, transportaría Cu⁺ hacia el xilema en

la raíz (Andres-Colas *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008). Estas ATPasas están implicadas en el transporte de sustratos a través de membranas en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP (Axelsen & Palmgren, 1998). El grupo P_{1B}-ATPasa, identificado tanto en procariotas como en eucariotas, transporta metales de transición. **En plantas se conocen también como HMA, de "Heavy Metal ATPase"**; (Andres-Colas *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2004). Este clado a su vez se subdivide en subclados, agrupando transportadores con afinidad por un mismo sustrato: el subclado P_{1b-1} transporta Cu⁺, mientras el subclado P_{1b-2} transporta Zn²⁺ (Argüello *et al.*, 2007; Argüello *et al.*, 2012). La afinidad por un determinado sustrato está definida por los aminoácidos de las tres hélices transmembrana más próximas al extremo carboxilo terminal. La topología de estos transportadores está constituida por 6 a 8 dominios transmembrana (Argüello *et al.*, 2007) (Figura 6). En arroz, el transportador OsHMA5 se localiza en las células del periciclo y de los tejidos vasculares y transporta cobre hacia los tejidos vasculares para su distribución a otros órganos (Deng *et al.*, 2013). AtHMA2 y AtHMA4, son dos ATPasas tipo P_{1B} se localizan en la membrana plasmática de los tejidos vasculares, promoviendo la carga de zinc al xilema (Eren & Argüello, 2004; Hussain *et al.*, 2004; Verret *et al.*, 2004). Ambos transportadores se expresan en la semilla, donde su función pasa a ser la de nutrir el endospermo con zinc, traspasando zinc desde los tejidos maternos (Guerinot, 2016). En Arabidopsis, el floema está conectado simplásticamente con la subierta de la semilla. AtHMA4, localizado en la cubierta del endotelio de la cubierta de la semilla, transporta zinc desde el simplasto hacia el endotelio. AtHMA2 contribuye a la redistribución del zinc por el tegumento filial (Olsen *et al.*, 2016).

Figura 6: Topología de un transportador P_{1b}-ATPasa tipo.

Una vez en el cilindro vascular, cobre y zinc son normalmente transportados en forma de complejos con ácidos orgánicos como nicotianamina (NA), ácido

desoximugeínico (DMA), citrato, ascorbato o compuestos fenólicos, que previenen el desencadenamiento de reacciones de toxicidad y facilitan su transporte por la estela (Flis *et al.*, 2016; Hazama *et al.*, 2015). Dentro del xilema, solo un 0,5 % del cobre se encuentra como cobre libre (Liao *et al.*, 2000); el resto se une con alta afinidad a NA (Liao *et al.*, 2000) y en menor proporción, a Histidina/Prolina (Irtelli *et al.*, 2009). En el mutante de tomate para la síntesis de NA *choronerva*, se detecta mayor concentración de cobre en los tejidos de la raíz, que disminuye en xilema y parte aérea de la planta en comparación con el silvestre (Higuchi *et al.*, 1996). Este fenotipo se restaura al aplicar NA (Pich & Scholz, 1996), sugiriendo el papel que juega la NA en el transporte de cobre en el xilema. Los genes para la síntesis de NA (NAS) se sobreexpresan en condiciones de deficiencia de cobre o zinc (Wintz *et al.*, 2003). De hecho, se relaciona la mayor abundancia de transcritos de NAS en *A. halleri* con la capacidad de hiperacumular zinc en esta especie respecto a *A. thaliana* (Clemens *et al.*, 2013; Deinlein *et al.*, 2012). Mientras que en el xilema el principal ligando de hierro parece ser el citrato (Álvarez-Fernández *et al.*, 2010; Rellán-Álvarez *et al.*, 2014), el principal ligando propuesto en el transporte de zinc y cobre tanto por xilema como por floema sería NA (Haydon *et al.*, 2012; Rellán-Álvarez *et al.*, 2008; von Wirén *et al.*, 1999). Sin embargo, la afinidad del zinc en fluidos provenientes de xilema y analizados por XRF (espectrómetro de fluorescencia por rayos X), es mayor por moléculas de citrato o de histidina, que por NA (Küpper *et al.*, 2004; Terzano *et al.*, 2008); en esas mismas muestras, el cobre exhibiría mayor afinidad por fenilalanina que por NA.

Una vez los metales han sido translocados por el xilema, su tasa de descarga también influirá en la nutrición vegetal. La descarga de zinc del xilema hacia las hojas estaría mediada por transportadores ZIP, como AtIRT3, un transportador ZIP localizado en la estela de todos los órganos de la planta (Lin *et al.*, 2009; Shanmugam *et al.*, 2011) (Figura 5). AtCOPT6 es una proteína de membrana plasmática que se expresa en los conductos vasculares de la parte aérea de la planta, contribuyendo a la redistribución de cobre en los tejidos fotosintéticos en *A. thaliana* (García-Molina *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2012).

Transporte a semillas

La distribución de metales desde las hojas al resto de órganos sumidero de la planta ocurre a través del floema (Zimmermann & Milburn, 2012). En los nodos del tallo y ramificaciones del cilindro vascular, los nutrientes minerales pueden ser transferidos directamente desde el xilema al floema (Andriunas *et al.*, 2013). Una gran parte del contenido mineral de la semilla proviene de la remobilización de nutrientes desde hojas ya senescentes (Himelblau & Amasino, 2001).

En el pH alcalino del floema, la solubilidad de los metales disminuye (Fukumorita *et al.*, 1983). Por ese motivo, los metales suelen encontrarse unidos a complejos que favorecen su solubilidad durante su transporte por el floema (Rellán-Álvarez *et al.*, 2008). Los transportadores YSL, capaces de transportar complejos metal-nicotianamina (NA), se han localizado en el floema tanto de *O. sativa* como de *Arabidopsis* (Aoyama *et al.*, 2009; Bashir *et al.*, 2010; Curie *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2003). **Las proteínas YSL (de "Yellow Stripe-like") se denominan así por el fenotipo "yellow stripe",** caracterizado por la clorosis intervenosa manifestada en plantas de maíz como resultado de la mutación del transportador de hierro YS1 (Curie *et al.*, 2009; von Wirén *et al.*, 1994). Los miembros de esta familia sólo se han identificado en plantas, aunque miembros de la superfamilia OPT **(de "Oligopeptide transporters")** a la que pertenecen, también están presentes en hongos (Lubkowitz, 2011). El modelado bioinformático de miembros de la familia YSL predice entre 11 y 16 dominios transmembrana (Conte & Walker, 2012) (Figura 7). La característica de este tipo de transportadores es su capacidad de transportar metal conjugado a NA o sus derivados (el ácido mugeínico (MA), ácido 2'-desoximugeínico (DMA), el ácido 3-epihidroximugeínico (epi-HMA) y el ácido 3-epihidroxi-2'-desoximugeínico (epi-HDMA) (Curie *et al.*, 2009; Higuchi *et al.*, 1996; Jean *et al.*, 2005). Asociados a ellos se pueden transportar hierro, zinc, cobre o níquel (Schaaf *et al.*, 2004a; Schaaf *et al.*, 2004b). AtYSL1 y AtYSL3 tienen una función redundante en el transporte de hierro, cobre y zinc en las semillas de *A. thaliana* (Waters *et al.*, 2006). De hecho, el doble mutante *ysl1ysl3* acumula mayor cantidad de cobre y zinc en hoja, mientras que reduce su contenido en estos metales en semilla. El cobre suele encontrarse unido a NA, aunque también se han encontrado complejos Cu-His en *O. sativa* (Ando *et al.*, 2013). AtYSL2 es capaz de transportar complejos Cu-NA (DiDonato *et al.*, 2004) así como OsYSL16 transfiere al floema Cu-NA desde órganos senescentes (Zheng *et al.*, 2012). La proteína CCH de *A. thaliana* interviene en la relocalización de cobre en el floema durante el reacondicionamiento de metales desde tejidos senescentes (Mira *et al.*, 2001a). Esta proteína tiene un dominio de unión a cobre característico de las chaperonas de la familia Atox y un dominio C-terminal específico de plantas, ausente en los miembros de la familia de otros reinos, con un papel regulatorio (Mira *et al.*, 2001a; Mira *et al.*, 2004; Mira *et al.*, 2001b; Puig *et al.*, 2007). CCH está presente solo en células anucleadas del cilindro vascular, siendo sintetizada en las células adyacentes, y transportada a través de plasmodesmos (Mira *et al.*, 2001a). Se piensa que, debido al pH del floema, al igual que ocurre con otros metales, el zinc viajaría conjugado con NA (Curie *et al.*, 2009; Nishiyama *et al.*, 2012).

Figura 7: Topología y sustratos de un transportador YSL tipo.

1.1.2. Distribución intracelular de metales

Las metaloproteínas intervienen en multitud de procesos fisiológicos, que suelen efectuarse compartimentalizados en orgánulos. Por eso, el contenido mayoritario de metales en la célula suele localizarse en el interior de los orgánulos (Blaby-Haas & Merchant, 2014). Durante el proceso de distribución de los metales hacia los orgánulos, se debe controlar la concentración citosólica de metales y su interacción inespecífica con otras moléculas para evitar reacciones indeseadas, como por ejemplo la generación de especies reactivas de oxígeno (Gill & Tuteja, 2010). Para sortear este problema, mientras se encuentran en el citoplasma, los metales suelen estar ligados a compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Las metalochaperonas son proteínas especializadas en trasladar el metal hacia el lugar de la célula donde se encuentra la metaloenzima de destino (Foster *et al.*, 2014; Haydon & Cobbett, 2007), siendo éstas especialmente importantes en la relocalización intracelular de cobre (O'Halloran & Culotta, 2000). Adicionalmente, el Cu^{2+} suele estar unido a histidina o el Cu^+ a metalotioneinas (Krämer *et al.*, 1996; Köster *et al.*, 2011; Pich & Scholz, 1996), mientras que el Zn^{2+} suele estar unido a glutatión, NA, histidina o metalotioneninas (Leszczyszyn *et al.*, 2007; Salt *et al.*, 1999; Trampczynska *et al.*, 2010).

Las proteínas que facilitan el desplazamiento del cobre desde el transportador hasta la metaloproteína donde llevará a cabo su actividad, se denominan cuprochaperonas (Blaby-Haas & Merchant, 2014; Wintz & Vulpe, 2002). En el caso del zinc, y al igual que otros metales, las proteínas similares a metalochaperonas a las que se asocia pertenecerían a la familia HIPP (Abreu-Neto *et al.*, 2013). Las proteínas de la familia HIPP intervienen en el mantenimiento de la homeostasis antes situaciones de estrés, incluyendo el estrés ocasionado por alteraciones en la

concentración de metal (Tehseen *et al.*, 2010; Zschiesche *et al.*, 2015). La redistribución a uno u otro orgánulo determinará el propósito final de cada metal.

Cloroplastos

Los cloroplastos son los orgánulos donde tiene lugar la fotosíntesis. La cadena de transporte de electrones de la maquinaria fotosintética requiere amplias cantidades de hierro y cobre. Las proteínas con mayor requerimiento de cobre de la planta, plastocianina y Cu/ZnSOD plastídica (CSD2) (Merchant & Bogorad, 1986; Sunkar *et al.*, 2006), se localizan en los cloroplastos. El transporte de cobre hacia el interior del cloroplasto implica a dos ATPasas tipo P, que funcionan en tándem (Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Sautron *et al.*, 2015; Tapken *et al.*, 2015). AtHMA6 (PAA1) (Catty *et al.*, 2011; Shikanai *et al.*, 2003) se localiza en la envuelta interna del cloroplasto y se encarga de introducir cobre en el estroma. La chaperona encargada de cederle cobre es PCH1, codificada por un evento de procesamiento alternativo del ARN (Aguirre & Pilon, 2015). AtHMA8 (PAA2) (Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Tapken *et al.*, 2012) se localiza en la membrana tilacoidal, introduciendo cobre hacia el lumen. Sin embargo, aún se desconoce cómo se redistribuye el zinc en el cloroplasto, y como se exporta de él en caso de exceso del metal.

Mitocondria

El cobre es esencial para el funcionamiento de la cadena de electrones mitocondrial. El cobre en la mitocondria es destinado principalmente al ensamblaje y actividad de la citocromo oxidasa (COX), en la cadena respiratoria de electrones. En *A. thaliana*, se ha descrito un homólogo de COX17, AtCOX17, que podía mediar el transporte de cobre hacia la mitocondria (Baladin y Castresana, 2002; Attallah *et al.*, 2007). En *S. cerevisiae*, el transportador de hierro MRS3 también interviene en el transporte de cobre hacia la mitocondria (Vest *et al.*, 2016). Hasta la fecha no se conocen homólogos de este transportador caracterizados en plantas. ScSCO1 (de **"synthesis of cytochrome oxidase"**) codifica par una proteína encargada del correcto ensamblaje del complejo IV, que interacciona directamente con COX. En *A. thaliana*, **existen dos homólogos de dicho gen, AtHCC1 (de "Homologous of Chaperone SCO")** directamente relacionado con la actividad COX, y AtHCC2, implicado en regulación redox (Attallah *et al.*, 2011; Steinebrunner *et al.*, 2014). Sin embargo, no existe hasta la fecha descripción de ningún transportador de plantas caracterizado capaz de introducir zinc en la mitocondria (Bashir *et al.*, 2016).

Retículo Endoplásmico

AtATX1 es una chaperona de cobre encargada de ceder el cobre a RAN1 (AtHMA7), una ATPasa de tipo P, localizada en el retículo endoplásmico (RE). RAN1 introduce cobre al lumen del RE donde pasa a formar parte de cuproproteínas (Himmelblau *et al.*, 1998; Hirayama *et al.*, 1999). Así el cobre se incorpora a cuproproteínas que siguen la ruta endocítica hasta llegar a su destino final, como es el caso del receptor de etileno ETR1 (Binder *et al.*, 2010). Al igual que con otros orgánulos, no existe descripción sobre el transporte de zinc en retículo hasta la fecha. Sin embargo, los miembros de la familia MTP/CDF, implicados en el transporte de zinc hacia orgánulos (Olsen & Palmgren, 2014), podrían estar interviniendo en el transporte de zinc hacia la vía de maduración y secreción proteica que comienza en el RE. MTP (Metal Tolerance Protein) es como se conocen en plantas a los miembros **de la familia CDF (de "Cation Difussion Facilitator")** (Wu & Eide, 2016). Filogenéticamente, estas proteínas se clasifican en tres clados caracterizados por su especificidad de sustrato: Fe^{2+} , Zn^{2+} o Mn^{2+} (Kolaj-Robin *et al.*, 2015). El primer clado contiene a las proteínas denominadas como Zn-MTPs (Gustin *et al.*, 2011). Un segundo clado engloba a proteínas con capacidad de transportar Mn^{2+} , como AtMTP8 (Pedas *et al.*, 2008), OsMTP8.1 (Chen *et al.*, 2013) o AtMTP11 (Delhaize *et al.*, 2007). Un tercer clado agrupa a los MTP identificados mediante ensayos bioinformáticos como transportadores de hierro y zinc (Montanini *et al.*, 2007), pero estos transportadores aún no han sido comprobados experimentalmente permitiendo corroborar su afinidad por uno u otro sustrato. La mayoría de proteínas CDF poseen 6 dominios transmembrana, extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos, y un dominio rico en histidinas entre los TMD4 y TMD5 específico de eucariotas (Kawachi *et al.*, 2008; Montanini *et al.*, 2007) (Figura 8), que define su capacidad de unión a un sustrato metálico como zinc. Pueden formar complejos homoméricos o heteroméricos (Eroglu *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2015). Un miembro de esta familia de transportadores en *S. cerevisiae*, Msc2 y otro en *S. pombe*, Shz, contribuyen al transporte de zinc hacia el RE (Clemens *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2004). Del mismo modo, otros miembros de la familia MTP en plantas, aún por identificar, podrían estar cumpliendo este cometido.

Figura 8: Topología y sustratos metálicos de un transportador MTP tipo.

Vacuola

La vacuola actúa como reservorio celular de metales. AtCOPT5 se localiza en el tonoplasto de las células de la endodermis (García-Molina *et al.*, 2011) y podría estar implicado en la movilización del cobre desde las vesículas prevacuolares hacia el citosol, interviniendo en la distribución de cobre desde la raíz a otros tejidos (Klaumann *et al.*, 2011). El zinc se podría almacenar en vacuolas de forma reversible (Ricachenevsky *et al.*, 2016). El transportador tonoplástico AtMTP1 contribuye a paliar el exceso de Zn, secuestrando el zinc en la vacuola tanto en raíz como en parte aérea (Delhaize *et al.*, 2003). Tanto AtMTP1 como AtMTP3 (Arrivault *et al.*, 2006; Kobae *et al.*, 2004) son transportadores de zinc, y ambos se localizan en el tonoplasto. Entre las familias de transportadores implicadas en la transferencia de metales al lumen de los orgánulos se encuentra la superfamilia Major Facilitator (MFS) (Pao *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2015). Esta superfamilia se caracteriza por el transporte antiporte de una amplia variedad de sustratos, desde azúcares o aminoácidos, hasta iones metálicos. Se ha propuesto que AtZIF1, un transportador perteneciente a la **superfamilia "Major Facilitator" contribuya indirectamente a la tolerancia de zinc, ya que importa NA libre en la vacuola** (Haydon *et al.*, 2012; Thomine & Vert, 2013).

Este esquema resumido de cómo una planta incorpora y distribuye metales considera a la planta como un organismo aislado, cuya capacidad de incorporar metal depende exclusivamente de sí, y que es el único usuario del metal. Este modelo, por tanto, no contempla plantas que están micorrizadas (el 85% puede establecer micorrizas) (Smith & Read, 2008) o posean nódulos que fijen nitrógeno (la mayor parte de las leguminosas) (Downie, 2014).

1.2. Captación de metales en plantas micorrizadas

A través de las hifas extraradicales en contacto con el suelo, los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) proveen a la planta del 20 al 50 % del metal necesario en su nutrición cuando la planta crece en suelos con baja biodisponibilidad de metales (Lee & George, 2005; Li *et al.*, 1991). Por el contrario, cuando la planta micorrizada crece en suelos con altos niveles de metales, el hongo realiza un efecto protector, reteniendo los metales tóxicos en su micelio y evitando que lleguen a la planta (Chen *et al.*, 2003). De este modo, se ha postulado que los hongos micorrícicos podrían actuar como agentes tamponadores de la captación de metales por la planta. Mosse (1957) describió los beneficios nutricionales que aportan los hongos micorrícicos, entre los que se encuentra una mayor acumulación de cobre en semillas de manzano. Este incremento nutricional no es fruto de una mayor solubilización de los metales en la rizosfera, sino que se trataría de una ruta indirecta de incorporación de metal en la que las hifas estarían implicadas (Smith & Smith, 2011). Así, estudios con metales marcados isotópicamente han permitido determinar que la mayor captación de metales por parte de plantas micorrizadas es debida a una entrega indirecta de los metales a la planta, que comenzaría en las hifas extraradicales (Figura 9) (Jansa *et al.*, 2003; Mehravaran *et al.*, 2000). Este proceso comprendería procesos de captación de metal por las hifas extraradicales, translocación por las hifas hacia las hifas intraradicales, transporte a la interfaz hongo- planta y finalmente, incorporación a la planta. Como consecuencia de esta ruta alternativa, los transportadores de metales normalmente activos en la ruta directa, son reprimidos transcripcionalmente (Burleigh, 2001; Burleigh *et al.*, 2003).

Análisis transcriptómicos han permitido identificar varios genes expresados en el micelio extrarradical, que codificarían para transportadores cuya función sería el importe de cobre zinc, hierro y manganeso (Tamayo *et al.*, 2014; Tisserant *et al.*, 2012; Tisserant *et al.*, 2013). El transporte de zinc desde el suelo al micelio extrarradical, al igual que en otros eucariotas, estaría mediado por proteínas de la familia ZIP (Guerinot, 2000). RiZRT1 sería un candidato de la familia ZIP identificado transcriptómicamente en el micelio de *Rizophagus irregularis*, que podría estar cumpliendo esta función (Figura 9) (Tamayo *et al.*, 2014). En el caso del transporte de cobre, los transportadores CTR son los encargados de importar cobre al citoplasma (Dumay *et al.*, 2006). Se han identificado dos transportadores de cobre (RiCTR1 y RiCTR3) (Tamayo *et al.*, 2014), entre los cuales es probable que al menos uno, se localice en la membrana plasmática de las hifas extrarradicales de *R. irregularis*. Sin embargo, ninguno de estos transportadores ha sido estudiado en profundidad, por lo que se desconoce su verdadera localización y función.

Figura 9: Transporte de metales por vía indirecta, a partir de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

El transporte de metales por las hifas podría estar asociado al transporte de polifosfato por las vacuolas (Figura 9). De hecho, el micelio extrarradical presenta los mayores niveles de zinc y cobre en el interior de la vacuola (González-Guerrero *et al.*, 2008). El transporte de metales hacia la vacuola del micelio extrarradical es un proceso que, por inferencia desde otros organismos eucariotas, debería ser efectuado por transportadores de las familias CDF/MTP (zinc) o P_{1b}-ATPasa/HMA (cobre o zinc). Genes que codifican P_{1b}-ATPasas han sido identificado en el genoma de *R. irregularis* (Tamayo *et al.*, 2014), como posibles transportadores de cobre en la vacuola. GintZnT1 es un transportador tipo CDF que introduciría zinc en la vacuola de *R. irregularis* en respuesta a altos niveles de zinc en el citosol (González-Guerrero *et al.*, 2005). Por otra parte, GintABC1 es un transportador tipo ABC identificado en *R. irregularis* implicado en la protección del micelio extrarradical frente a toxicidad de cobre que también podría acumular este metal en la vacuola (González-Guerrero *et al.*, 2010).

Una vez las vacuolas llegan al arbusculo, el polifosfato se hidroliza y los

metales asociados se extruyen al citoplasma (Figura 9). Los transportadores identificados que podrían mediar la salida de los metales de la vacuola en el micelio intrarradical pertenecerían en el caso de zinc o cobre, respectivamente, a las familias ZIP o CTR (Tamayo *et al.*, 2014). Una vez los metales alcanzan el citoplasma del micelio intrarradical, deben ser liberados al apoplasto del espacio periarbuscular. No se han caracterizado transportadores implicados en este paso, pero el estudio del transcriptoma del micelio intrarradical sugiere varios candidatos que intervendrían en este paso, como algún miembro de la familia CDF o P_{1b}-ATPasa (Hildebrandt *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2014).

Esto implica que a nivel del arbúsculo, la planta tiene transportadores que recuperan el metal liberado por el hongo micorrícico en el espacio periarbuscular, de modo parecido a como ocurre con la transferencia de fosfato y otros macroelementos (Javot *et al.*, 2007; Guether *et al.*, 2009) (Figura 9). Estudios de transcriptómica han identificado transportadores de metales de las familias ZIP (Gomez *et al.*, 2009; Handa *et al.*, 2015; Hogeekamp *et al.*, 2011), COPT (Gaude *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2009; Hogeekamp *et al.*, 2011; Hogeekamp & Küster, 2013) y OPT (Gaude *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2009; Hogeekamp *et al.*, 2011; Kobae *et al.*, 2014) que se encuentran sobreexpresados en células corticales de raíces micorrizadas. Sin embargo, no existe evidencia experimental de su localización o papel en la captación de metales desde el arbúsculo.

De este modo, los hongos formadores de micorrizas arbusculares contribuirán a mejorar la captación de metales de transición por la planta hospedadora cuando se encuentre en suelos con bajos niveles de metales. Esto permitirá una mayor entrega de estos nutrientes limitantes a los órganos sumideros, principalmente hojas y semillas, aunque en el caso de las leguminosas se detecta un sumidero adicional: los nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces.

2. Nódulos radicales

Los nódulos son órganos formados como resultado de la de la interacción simbiótica entre leguminosas y bacterias diazotróficas conocidas genéricamente como rizobios. En ellos se produce la forma más común de la fijación simbiótica de nitrógeno, la conversión de nitrógeno atmosférico en amonio catalizado por la enzima bacteriana nitrogenasa (Rubio & Ludden, 2005).

2.1. Desarrollo del nódulo

El nódulo se desarrolla tras el intercambio de señales entre bacteria y planta, mediante un proceso muy regulado (Oldroyd *et al.*, 2005; Oldroyd, 2013; Udvardi & Poole, 2013). Las vías de señalización que se establecen en esta simbiosis comparten

muchos elementos con la de las micorrizas, lo que indica que la primera surgió a partir de la última (Binder *et al.*, 2014; Gutjahr & Parniske, 2013; Harrison, 2005, 2012; Parniske, 2008; Schmitz & Harrison, 2014).

Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides, que actúan como quimioatrayentes de rizobios. Al igual que ocurre en los hongos formadores de micorrizas arbusculares, los rizobios secretan un tipo de lipoquitooligosacaridos (LCOs) conocidos en su conjunto como Factores Nod (NF; Hassan & Mathesius, 2012). A pesar de su parecido bioquímico, los NF determinan la especificidad de huésped de un determinado rizobio (Wang *et al.*, 2012). Las leguminosas perciben los LCOs mediante receptores de membrana plasmática tipo LysM (Limpens *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007). Una vez que los NF se han unido al receptor, se activa la ruta de transducción de señal común (TSC) (Genre & Russo, 2016; Oldroyd *et al.*, 2005). Todas las proteínas englobadas en la TSC son imprescindibles; si una de ellas es mutada, la simbiosis se aborta (Oldroyd, 2013). En la simbiosis que desencadenará el fenómeno de nodulación, la ruta TSC inicia dos programas paralelos: el epidérmico y el cortical (Xiao *et al.*, 2014).

Durante el programa epidérmico, los NF llevan a la progresión del canal de infección hasta alcanzar la base del pelo radicular que lo contiene (Figura 10). En este proceso, la percepción de los NF desencadena una oscilación en los niveles de Ca^{2+} nucleares que provocan cambios en la expresión génica nuclear. MtDMI1 es un canal permeable al potasio localizado en el RE que genera una oscilación en los niveles de calcio automantenida (Ané *et al.*, 2004; Charpentier *et al.*, 2013; Charpentier *et al.*, 2016). MtDMI3 es una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Ané *et al.*, 2002; Messinese *et al.*, 2007), capaz de unirse a Ca^{2+} y descifrar la señal implícita en las oscilaciones de Ca^{2+} . Tras la interpretación del patrón de oscilación de Ca^{2+} , MtDMI3 genera la activación de múltiples factores de transcripción como son IPD3, NIN, o ERN1 (Cerri *et al.*, 2012; Combier *et al.*, 2006; Delaux *et al.*, 2013; Horváth *et al.*, 2011; Marsh *et al.*, 2007; Smit *et al.*, 2005). La intervención de estos factores de transcripción es crucial para el comienzo de la infección, el curvamiento del pelo radicular, la inducción de la actividad génica en las células corticales o el mantenimiento del meristemo del nódulo (Kang *et al.*, 2016). La curvatura del pelo radicular viene seguida del desarrollo de canal de infección, por el que las bacterias van avanzando hasta alcanzar la base del pelo radicular. Paralelo a este proceso de infección radicular, tiene lugar el desarrollo morfológico del nódulo, que ocurre a través del programa cortical.

Figura 10: Desarrollo de un nódulo radicular. 1) Secreción de flavonoides por la planta, percepción de rizobios y detección de factores Nod. 2) Curvamiento del pelo radicular. 3) Desarrollo del canal de infección. 4) Progresión hasta las células corticales del canal de infección. 5a) Nódulo determinado. 5b) Nódulo indeterminado donde se señalan las zonas I (meristemo), II (infección-diferenciación), III (fijación) y IV (senescencia).

En el programa cortical, se regula la organogénesis del nódulo, también iniciada por MtDMI3 (Messinese *et al.*, 2007). La formación del primordio del nódulo comienza con divisiones celulares del periciclo, que se van extendiendo hacia capas más externas y que van a generar la formación del primordio del nódulo (Xiao *et al.*, 2014). Cuando el programa cortical finalice, la estructura del nódulo estará bien definida. En función de la especie de leguminosa en la que se desarrollen los nódulos, éstos serán determinados o indeterminados (Figura 10). A diferencia de los nódulos determinados, los indeterminados se caracterizan por el mantenimiento de una región meristemática en su ápice, que permite establecer una zonación a lo largo del nódulo con los estadios de desarrollo y diferenciación morfológica típicos de la fijación de nitrógeno: La Zona I es la región meristemática, la Zona II la región donde los rizobios son liberados en el córtex y comienzan a diferenciarse, la Zona III contiene bacteroides ya diferenciados y es donde tiene lugar la fijación de nitrógeno, y la Zona IV es la zona de senescencia (Vasse *et al.*, 1990). Además, algunos autores distinguen la interzona entre las Zonas II y III, donde la presión de oxígeno cae (Roux *et al.*, 2014; Soupène *et al.*, 1995)

2.2. Fijación simbiótica de nitrógeno.

El nódulo constituye el nicho donde los rizobios se diferencian a bacteroides y pueden fijar nitrógeno (Raymond *et al.*, 2004). En este proceso intervienen multitud de enzimas, entre las que destaca la nitrogenasa, y numerosos transportadores.

Aproximadamente, 6 g de carbono fijado en fotosíntesis son intercambiados por 1 g de nitrógeno fijado en los nódulos (Udvardi & Poole, 2013). La dependencia de la bacteria en este tipo de relación simbiótica es extensiva a otros nutrientes, no sólo al carbono. La relación simbiótica rizobio-leguminosa sienta sus bases en el intercambio nutricional (Demeterio *et al.*, 1972). Para ello, los nutrientes deben atravesar tanto la membrana de la planta (o membrana del simbiosoma) como la membrana del bacteroide. La membrana del simbiosoma controla los flujos de nutrientes hacia y desde los bacteroides (Rosendahl *et al.*, 1991). Esto implica que cambios en la nutrición mineral de la planta también afectan a la nutrición de los bacteroides.

La fijación de nitrógeno está catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, que constituye el 10 % de la proteína total de los bacteroides (Miller *et al.*, 1993). Este complejo está constituido por dos ferrosulfoproteínas: la dinitrogenasa o componente I, es un tetrámero que requiere un cofactor de hierro y molibdeno, mientras que la dinitrogenasa reductasa o componente II, es un dímero que requiere de un cofactor férrico (Miller *et al.*, 1993; Rubio & Ludden, 2005). Este complejo enzimático cataliza la reacción:

El control del oxígeno es crítico para el correcto funcionamiento de la fijación simbiótica de nitrógeno. Tanto la funcionalidad de la nitrogenasa, como la transcripción de *NifH*, el gen que la codifica, son susceptibles de ser inhibidos por O₂ (Hennecke *et al.*, 1985; Ditta *et al.*, 1987). Pese a ello, los rizobios son organismos aerobios estrictos, empleando el O₂ para respiración y metabolismo energético, que se encarga de satisfacer la alta demanda de energía de la nitrogenasa (Halbleib & Ludden, 2000). Para evitar la inactivación de la enzima, se crea un ambiente microaerobio en torno a los bacteroides. Por una parte, existe un gradiente de difusión de oxígeno decreciente desde las capas más externas del nódulo a las células donde está teniendo lugar la fijación de nitrógeno. Por otra parte, la proteína más abundante del nódulo es la leghemoglobina (Appleby, 1984; Ott *et al.*, 2005), cuyo grupo hemo se une al oxígeno con alta afinidad. La leghemoglobina se encarga de mantener los niveles de oxígeno en el nódulo, permitiendo la respiración oxidativa de los bacteroides, pero sin inactivar a la nitrogenasa (Appleby, 1984). Así, la combinación de la acción de la leghemoglobina, junto con las modificaciones estructurales del nódulo, logran que la presión de O₂ en la Zona III del nódulo esté en torno a 0,01 mm Hg, suficiente como para que la nitrogenasa funcione eficientemente (Wittenberg, 1974).

La nitrogenasa requiere una gran cantidad de ATP para llevar a cabo la

catálisis de nitrógeno atmosférico a amonio (Halbleib & Ludden, 2000). Para conseguir esta energía las células infectadas alcanzan una alta tasa de respiración celular, que consume el oxígeno a la vez que aporta energía en forma de ATP. La enzima clave en este proceso es una COX de tipo cbb3 (Presisig *et al.*, 1996), con alta afinidad por el oxígeno, capaz de usar O₂ como aceptor de electrones incluso a muy bajas concentraciones. La oxidasa cbb3 posee como cofactores hierro y cobre (Pilon *et al.*, 2006; Reedy & Gibney, 2004). Los metales empleados como cofactores proteicos en la FSN, al igual que otros nutrientes, son suministrados al bacteroide por la planta.

Las membranas simbiosomal y peribacteroidal regulan el paso de metabolitos entre la planta hospedadora y el rizobio. Para ello, ambas membranas contienen canales y transportadores específicos y altamente regulados. El nutriente prioritario de paso es el carbono, que la planta cede en forma de fotosintatos a cambio de nitrógeno fijado. A medida que el rizobio se adapta de la vida en la rizosfera para formar un simbiosoma, va experimentando cambios en la transcripción de genes para el metabolismo del carbono y el transporte de compuestos orgánicos (Karunakaran *et al.*, 2009). En su madurez, los bacteroides se centran en catabolizar ácidos orgánicos, como fuente para la obtención de ATP. La principal molécula transportada y asimilada por los bacteroides es el malato (Day & Copeland, 1991), pero también son abundantes otros ácidos tricarboxílicos como succinato o fumarato (Tejima *et al.*, 2003). Sin embargo, a día de hoy se desconoce el transportador implicado en el abastecimiento del simbiosoma con estos productos metabólicos. El destino metabólico de los ácidos orgánicos introducidos es el mantenimiento de la actividad de la nitrogenasa, cuyo producto de reacción final es amoniaco (Udvardi & Day, 1997). El paso del amonio al espacio peribacteroidal ocurre por difusión. Al ser una superficie ácida, el amoniaco se protona. El ion amonio pasa al citoplasma de la planta por dos vías complementarias: por difusión facilitada (Niemiets & Tyerman, 2000), o por transporte activo facilitado por el potencial de membrana generado por una H⁺ ATPasa de membrana peribacteroidal (Fedorova *et al.*, 1999; Tyerman *et al.*, 1995). Una vez en el citoplasma de la planta, el amonio es reconvertido a aminoácidos por la acción de la glutamina sintasa (GS), la glutamato sintasa (GOGAT) y la aspartato aminotransferasa (Vance & Gantt, 1992). Finalmente, esos aminoácidos abandonan el nódulo y son transportados a otras partes de la planta. El azufre interviene en la fijación del nitrógeno formando parte de grupos metálicos que acompañan a la apoproteína de la nitrogenasa. En su camino al bacteroide, el azufre es transportado por proteínas tipo SST de la familia SulP a través de la membrana peribacteroidal (Krusell *et al.*, 2005). Los transportadores tipo ABC de molibdato (ModABC) facilitan la entrada de sulfato a través de la membrana simbiosomal, cuando la concentración

de sulfato en el medio es elevada (Delgado *et al.*, 2006).

3.3. Metales y fijación simbiótica de nitrógeno

Dados los elevados niveles de expresión de algunas metaloenzimas esenciales para la fijación de nitrógeno, la demanda de metales de una planta nodulada ha de ser mayor que la de una no nodulada. Como consecuencia, la prevalente baja biodisponibilidad de muchos de estos metales en suelos tiene un impacto negativo en la fijación de nitrógeno. De este modo, la deficiencia de nutrientes como hierro (Tang *et al.*, 1990; Terry *et al.*, 1991), cobre (Snowball *et al.*, 1980) o zinc (Ibrikci & Moraghan, 1993), conlleva la disminución de la capacidad de fijar nitrógeno (O'Hara, 2001).

A priori, los metales que van a ser usados en la fijación simbiótica de nitrógeno podrían llegar de tres posibles fuentes: i) directamente del suelo, a través de la epidermis del nódulo, ii) a través del sistema vascular del nódulo, desde la raíz, y iii) a partir de reserva preexistentes de metales en el nódulo. Cada una de estas posibilidades involucraría distintos tipos de transportadores y tejidos. Estudios de la distribución de metales a lo largo del nódulo efectuado por S-XRF (de **"Synchrotron X-Ray Fluorescence"**) (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013), permitió postular un modelo en que el metal se transportaría al nódulo a través de los haces vasculares y se liberaría al apoplasto de la Zona II, donde sería incorporado al interior de los bacteroides para poder ser funcionales en la Zona III. Basándonos en este modelo, transportadores de distintas familias colaborarían en la descarga de metales del cilindro vascular al apoplasto de zona II, su incorporación a través de la membrana plasmática y su transferencia al interior de los bacteroides (Figura 11).

Por analogía a lo que ocurre en otras partes de la planta, si los metales llegan por el xilema, probablemente estarán asociados a citrato (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010). Esta hipótesis se ve reflejada por la existencia de un transportador de citrato, LjMATE, en nódulos de *Lotus japonicus* (Takanashi *et al.*, 2013). Estudios de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus* indican que cataliza la salida citrato de la célula. Cuando se muta *LjMATE1*, las plantas acumulan hierro en la vasculatura y presentan menor actividad nitrogenasa que el silvestre, posiblemente como resultado de una menor cantidad de hierro en las células infectadas (Takanashi *et al.*, 2013). LjMATE1 estaría facilitando la descarga de hierro-citrato del xilema hacia el apoplasto de la zona de infección del nódulo (Takanashi *et al.*, 2013), actuando de manera similar al transportador de citrato FRD3 en semillas de *A. thaliana* (Roschztardt *et al.*, 2011). En cambio, si los metales llegaran al nódulo a través del floema, probablemente estarán asociados a NA (Rellán-Álvarez *et al.*, 2008). Un gen de una nicotianamina sintasa de *M. truncatula* parece estar implicado en el mantenimiento

The diagram illustrates the transport of iron and micronutrients in the root of a legume. The root is divided into four zones: Zona I, Zona II, Zona III, and Zona IV. The vascular tissue (Haz Vascular) is located in Zona IV. A black box in Zona II indicates the area shown in the detailed inset.

The inset shows the transport of various nutrients across different cell types: Xilema, Periciclo, Endodermis, Células no infectadas, and Células infectadas. The nutrients are represented by colored dots: red for Iron (Hierro), dark blue for Citrate (Citrato), green for Zinc (Zinc), and orange for Copper (Cobre).

Transporters and Mechanisms:

- Xilema:** Transport of nutrients from the vascular tissue.
- Periciclo:** Transport of nutrients from the xylem into the pericycle.
- Endodermis:** Transport of nutrients from the pericycle into the endodermis.
- Células no infectadas:** Transport of nutrients from the endodermis into non-infected cells.
- Células infectadas:** Transport of nutrients from non-infected cells into infected cells.

Specific Transporters and Mechanisms:

- Iron (Hierro):** Transported by Nramp? ZIP? COPT? YSL? in the pericycle and endodermis, and by Nramp? ZIP? COPT? CTR? in infected cells.
- Citrate (Citrato):** Transported by LjMA TE in the endodermis.
- Zinc (Zinc):** Transported by GmPLAC8? and GmZIP1 in infected cells.
- Copper (Cobre):** Transported by GmDMT1 in infected cells.

Membranes:

- Membrana Plasmática:** The plasma membrane of the infected cells.
- Membrana Simbiosoma:** The symbiosome membrane.
- Membrana Externa:** The external membrane of the symbiosome.
- Membrana Interna:** The internal membrane of the symbiosome.

Legend:

- Red dot: Hierro (Iron)
- Dark blue dot: Citrato (Citrate)
- Green dot: Zinc (Zinc)
- Orange dot: Cobre (Copper)

presenta los mayores niveles de expresión en nódulos entre todos los analizados en transcriptomas.

Una vez el metal ha entrado en las células infectadas, debe atravesar la membrana simbiosomal en su camino hacia el bacteroide. El proceso de traslado del metal desde la membrana plasmática a la membrana del simbiosoma, podría ocurrir siguiendo el mismo patrón que en la distribución citoplásmica de metales hacia los distintos orgánulos de la célula, probablemente en respuesta a una mayor demanda. El proceso de tráfico intracitosólico de metales es aún desconocido. Una vez en la membrana simbiosomal, se requieren transportadores para transferir el metal al bacteroide. Dos transportadores, GmZIP1 (Moreau *et al.*, 2002) y GmDMT1 (Kaiser *et al.*, 2003), han sido propuesto como candidatos a introducir zinc y hierro en el simbiosoma, respectivamente. El primero es un transportador de la familia ZIP y el segundo de la familia Nramp. Ambos transportadores se encuentran localizados en la membrana simbiosomal. Sin embargo, GmZIP1 es capaz de complementar el mutante de levadura *zrt1/zrt2*, indicando la capacidad de introducir zinc en el citoplasma (Moreau *et al.*, 2002), mientras que GmDMT1 complementa el fenotipo de menor captación de hierro del doble mutante *fet3/fet4* (Kaiser *et al.*, 2003). De este modo, *in vivo*, estas proteínas no estarían transportando metal hacia el simbiosoma, sino en el sentido contrario. De este modo, es posible que el verdadero papel de GmZIP1 y GmDMT1 sea evitar la acumulación de concentraciones tóxicas de metal en el espacio peribacteroidal. Los candidatos más plausibles para el transporte de metales en la membrana simbiosomal, por analogía al transporte al interior de un orgánulo podrían pertenecer a las familias P_{1b}-ATPasa para cobre o zinc, o CDF para zinc. Un candidato para el transporte de hierro a través de la membrana del simbiosoma con alta similaridad a los miembros de la familia VIT/CCC1 es LjSEN1. LjSEN1 se localiza en células infectadas de nódulos en desarrollo de *L. japonicus* (Hakoyama *et al.*, 2012). El mutante *sen1* desarrolla nódulos que son infectados por rizobios, pero carece por completo de actividad nitrogenasa. Los autores relacionan este fenotipo con la incapacidad de *sen1* de transportar metales, posiblemente hierro, a través de la membrana del simbiosoma. Más recientemente, algunas proteínas de la superfamilia PLAC8 se han encontrado en el proteoma de membrana simbiosomal de *G. max* (Clarke *et al.*, 2014). Miembros de la familia PCR, a la que pertenece PLAC8, se han descrito en *A. thaliana* como transportadores de zinc o cadmio (Song *et al.*, 2010). Se piensa que estas proteínas se encargarían del transporte de zinc (Clarke *et al.*, 2014). Sin embargo, estudios transcriptómicos no muestran ninguna P_{1b}-ATPasa expresada a altos niveles en nódulos de *M. truncatula*, aunque sí un CDF, *MtMTP2*, que alcanza un máximo de expresión en nódulos (Benedito *et al.*, 2008).

Una vez el metal ha cruzado la membrana del simbiosoma, se acumula en el

espacio peribacteroidal (LeVier *et al.*, 1996; Moreau *et al.*, 1998; Wittemberg *et al.*, 1996) antes de ser introducido en los bacteroides para su correcta utilización. En *S. fredii*, los transportadores de alta afinidad por zinc pertenecen a la familia Znu, que a su vez forma parte de la familia ABC (ATP-binding cassette) (Vahling-Amstrong *et al.*, 2012). El mutante *znuA* de *S. fredii*, no puede sintetizar su principal sistema de captación de zinc, forma un mayor número de nódulos, pero todos ellos prácticamente afuncionales (Jiao *et al.*, 2016). La identidad de los transportadores que mediarían el importe de hierro, cobre o zinc aún no ha sido descrita para *S. meliloti*. El mantenimiento de la homeostasis de metales en el interior de los bacteroides evita que éstos experimenten toxicidad por abundancia de metal. En caso de exceso de metal, éste es devuelto al espacio peribacteroidal. En el caso de *S. meliloti*, se han identificado en su genoma 5 Cu⁺-ATPasas, subdivididas por su funcionalidad: las del tipo CopA1 se especializan en transportar el exceso de cobre al exterior, mientras las del tipo CopA2 (también descritas como FixI1 o FixI2) (Kahn *et al.*, 1989; Raimunda *et al.*, 2011) se transcriben junto con una citocromo oxidasa y contribuyen al ensamblaje de la metaloproteína (Preisig *et al.*, 1996b). Un tercer tipo se conoce como CopA3 y contribuye a la diferenciación de los rizobios a bacteroides (Patel *et al.*, 2014). En el caso del hierro, se ha descrito que el transportador FeoAB de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 está relacionado con la extrusión de hierro desde los bacteroides en soja. En *S. meliloti*, un tipo de ATPasa tipo P_{1B} interviene también ante condiciones de exceso de Zn²⁺ (ZntA) (Lu *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

El Objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la identificación de aquellos transportadores implicados en la entrega de cobre y zinc a los nódulos fijadores de nitrógeno de la leguminosa modelo *M. truncatula*. Para ello se han de realizar las siguientes tareas:

1.- Identificar los transportadores de cobre y zinc que funcionan en el nódulo. Para ello, se determinarán los miembros de las principales familias de transportadores de cobre y zinc en *M. truncatula*, se estudiarán sus niveles de expresión en nódulos, y se validará su capacidad de transportar cobre o zinc.

2.- Determinar el papel de los transportadores seleccionados en la fijación simbiótica de nitrógeno en nódulos de *M. truncatula*. Así se estudiarán la localización tisular y celular de cada uno de los transportadores seleccionados y se evaluará el fenotipo de plantas mutadas en los genes que codifican los transportadores de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico y condiciones de crecimiento.

1.1. *Medicago truncatula*

Se usaron dos ecotipos de *M. truncatula*: R108 para estudiar la simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*, y A17 en el caso de simbiosis con *Rhizophagus irregularis*. Las semillas se escarificaron con 95 % (v/v) H₂SO₄ durante 7,5 minutos. Se lavaron con agua y se esterilizaron con 40 mg/ml NaClO durante 90 segundos, y se enjuagó repetidamente (al menos 8 veces) con agua estéril. Las semillas se embebieron en agua durante 16 horas en la oscuridad. Posteriormente, se depositaron en placas de 0,8 % agar en agua y se estratificaron a 4 °C durante 48 horas. Estas semillas se germinaron durante 48 horas a 22 °C. Para su propagación se empleó turba:vermiculita (3:1) como sustrato en condiciones de 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Las plantas fueron regadas 3 veces por semana en días alternos con agua o solución Jenner (Brito *et al.*, 1994).

La inoculación con *S. meliloti* se realizó en macetas de perlita estéril. Una vez transferidas las plántulas, se inocularon con 2 ml de un cultivo saturado de *S. meliloti*. Estas bacterias se cultivaron durante 16 horas a 28 °C en TY o YMB (composición en apartado 2.3), se centrifugaron a 3000 xg y el sedimento se resuspendió en agua. Las condiciones de crecimiento fueron 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C, combinando riegos alternos de solución Jenner o agua, tres veces por semana. Como control sin inocular se sustituyó el inóculo de *S. meliloti* por riegos cada dos semanas con una solución nutritiva suplementada con 2 mM NH₄NO₃.

Los ensayos de micorrización se realizaron con *M. truncatula* A17. En ellos, las semillas ya embebidas y estratificadas se transfirieron a un semillero de vermiculita estéril. Allí crecieron durante 7 días en condiciones de 16 horas de fotoperiodo y temperatura de 22° C. Una vez que la radícula ha alcanzado un tamaño igual o superior a los 2 cm, las plántulas se transfirieron a macetas de arena:vermiculita (1:1) estéril, con 0,5 g/l de osmocote. Cada plántula se inoculó con 2 ml de solución de *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (Mycovitro, España). Los controles sin micorrizar se inocularon con 2 ml de agua estéril.

1.2. *Nicotiana benthamiana*

Para el crecimiento de *N. benthamiana*, se empleó turba:vermiculita (3:1). Las condiciones de crecimiento fueron 16 h de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Las plantas fueron usadas tras 4 semanas de crecimiento.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas empleadas en esta tesis están recogidas en la Tabla 1. Estas levaduras se cultivaron en YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose; (Sherman *et al.*,

1981), SD (Synthetic Defined) (Sherman *et al.*, 1981) suplementado con los aminoácidos y las bases nitrogenadas requeridas determinadas por las auxotrofías de cada cepa concreta o YPEG (Yeast extract-Peptone-Ethanol-Glycerol; (Dancis *et al.*, 1994) durante 3-5 días a 28°C. La composición de estos medios se detalla en apartado 2.2.

Tabla 1: Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Gen mutado	Fenotipo	Origen
DEY1451	<i>MATa ade2/+ can1 his3 leu2 trp1 ura3</i>			(Dix <i>et al.</i> , 1994)
DEY1453	<i>MATa ade2/+ can1 his3 leu2 trp1 ura3 fet3-2::HIS3 fet4-1::LEU2</i>	<i>Δfet3 Δfet4</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de hierro, pH alcalino	(Eide <i>et al.</i> , 1996)
DY1457	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>			
ZHY3	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i>	<i>Δzrt1 Δzrt2</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de zinc, EDTA	(Zhao & Eide, 1996a, 1996b)
<i>ΔzrcΔcot1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 Zrc1::his3 cot1::ura3</i>	<i>Δzrc1Δcot1</i>	Supresión de crecimiento en alta concentración de zinc	(MacDiarmid <i>et al.</i> , 2000)
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3</i>			Thermo Scientific
BY4742Δsmf1	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3 Δsmf1</i>	<i>Δsmf1</i>	Supresión de crecimiento a alta concentración de manganeso	Thermo Scientific
DY4741Δctr1	<i>MATa, his3 leu2 met15 ura3 ctr1::ura3</i>	<i>Δctr1</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de cobre, medios no fermentables	Thermo Scientific
DY150	<i>MATa Ura3 leu2 trp1 his3 ade2 can1</i>			
CCC1	<i>MATa Ura3 leu2 trp1 his3 ade2 can1 ccc1::HIS3</i>	<i>Δccc1</i>	Supresión de crecimiento en alta concentración de hierro	(Li <i>et al.</i> , 2001)

1.4. *Sinorhizobium meliloti*

Las cepas utilizadas durante esta tesis se recogen en la Tabla 2. Las cepas se crecieron en TY (Tryptone Yeast) (Beringer, 1974) o YMB (Yeast Mannitol Broth) (Vincent, 1970) suplementado con los antibióticos correspondientes, a 28 °C durante 24-48 horas. La composición de estos medios se detalla en los apartados 2.3.1 y 2.3.2.

Tabla 2: Cepas de *S. meliloti*

Cepa	Plásmido	Resistencia (µg/ml)	Genotipo	Origen
<i>S. meliloti</i> 2011	-	Estreptomina 200 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de SU47	(Lerouge <i>et al.</i> , 1990)
<i>S. meliloti</i> 2011	pCH60	Estreptomina 200 Tetraciclina 10 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S. meliloti</i> 2011	(Cheng & Walker, 1998)
<i>S. meliloti</i> 1021	pCMB13 DsRED	Estreptomina 200 Espectinomicina 75 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S. meliloti</i> 1021 Str21	(Meade <i>et al.</i> , 1982)

1.5. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* usadas se detallan a continuación. Todas ellas se crecieron en LB (Luria–Bertani) (Bertani, 1951) usando antibióticos cuando fuera necesario, a 37 °C.

- *E. coli* DH5α (Hanahan, 1983): Genotipo F- $\Phi 80$ *lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*. Selección por interrupción de *lacZ* usando como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal).
- *E. coli* DB3 (Bernard & Couturier, 1992): Genotipo F- *gyrA462 endA1* Δ(*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20*(rB-, mB-) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(SmR) *xyl-5 λ- leu mtl1*. Resistencia a la toxicidad del gen *cddB*.

1.6. *Agrobacterium rhizogenes*

La cepa *A. rhizogenes* ARqua1, derivada de A4T (Boisson-Dernier *et al.*, 2001), cuyo genotipo es pRiA4-Onc⁺ Str^R, se creció en LB (Bertani, 1951), con los antibióticos apropiados, a 28°C.

1.7. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985) es una cepa desarmada, sin p58C1. Esta cepa se creció en LB (Bertani, 1951), con los antibióticos apropiados a 28°C.

Las cepas de microorganismos descritas en los apartados 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7 se crecieron hasta alcanzar fase estacionaria y parte de ese cultivo se usó para conservarlas en glicerol al 20 % estéril a -80 °C.

1.8. *Rhizophagus irregularis*

Las esporas de *R. irregularis* DAOM197198 (Mycovitro, España) se conservaron hasta su utilización a 4 °C. Por cada planta a micorrizar se usaron 2 ml de solución (Mycovitro, España).

2. Medios de cultivo y solución de riego.

2.1. Medios y soluciones de plantas.

2.1.1. Medio Fahreaus

Este medio (Dazzo, 1982) se utilizó para el crecimiento *in vitro* de *M. truncatula*.

0,01 % (p/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,012 % (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,01 % (p/v) KH_2PO_4

0,015 % (p/v) Na_2HPO_4

0,0005 % (p/v) Citrato férrico en HCl 0,1 N

0,001 % (v/v) Mix micronutrientes

2 % (p/v) Agar bacteriológico

Solución ajustada a pH 6,5.

Mix micronutrientes: 0,203 % (p/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,022 % (p/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,008 % (p/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01075 % (p/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,057 % (p/v) H_3BO_3 .

2.1.2. Solución Jenner

Esta solución se empleó para regar las plantas cultivadas en sustratos inertes como la perlita (Brito *et al.*, 1994).

0,015 % (p/v) KCl

0,0345 % (p/v) K_2HPO_4

0,049 % (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,001 % (v/v) Mix oligoelementos

0,0018 % (p/v) Citrato férrico en HCl 0,1 N

0,43 % (p/v) CaSO_4

Solución ajustada a pH 6,7.

Mix oligoelementos: 0,203 % (p/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,022 % (p/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,008 % (p/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001 % (p/v) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,143 % (p/v) H_3BO_3 .

2.2 Medios y soluciones de levaduras

2.2.1. Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)

El medio YPD (Sherman *et al.*, 1981) es un medio rico de crecimiento de cepas

de *S. cerevisiae*.

2 % (p/v) Peptona bacteriológica

1 % (p/v) Extracto de levadura

2 % (p/v) Glucosa

El medio sólido se preparó añadiendo 2% de agar bacteriológico.

2.2.2. Synthetic Dextrose (SD)

El medio SD (Sherman *et al.*, 1981) se utilizó como medio mínimo de crecimiento de cepas de *S. cerevisiae*.

0,67 % (p/v) YNB ("yeast nitrogen base" sin aminoácidos, Difco®)

2 % (p/v) Glucosa

El medio se mantuvo a pH 5,4, salvo cuando se usó con la cepa *fet3fet4*, cuyo pH se ajustó a 3,5, adicionando 0,1 N HCl. El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2% agar bacteriológico o 2% de agarosa. Cuando fue necesario, se adicionaron los siguientes requerimientos nutricionales: 0,01 % de Adenina, Histidina, Leucina, Lisina, Metionina, Triptófano o Uracilo.

2.2.3. Yeast extract-Peptone-Ethanol-Glycerol (YPEG)

El medio YPEG (Dancis *et al.*, 1994) se utilizó en algunos ensayos fenotípicos de levadura.

2 % (p/v) Peptona bacteriológica

1 % (p/v) Extracto de levadura

2 % (v/v) Glicerol

2 % (v/v) Etanol

2 % (p/v) Agar

2.3. Medios y soluciones de bacteria

2.3.1 Tryptone Yeast (TY)

El medio TY (Beringer, 1974) se usó como medio rico de crecimiento de cepas de *S. meliloti*.

0,6 % (p/v) Triptona

0,3 % (p/v) Extracto de levadura

0,05 % (p/v) CaCl₂

El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2% agar bacteriológico.

2.3.2. Yeast Mannitol Broth (YMB)

El medio YMB (Vincent, 1970) se usó como medio mínimo de crecimiento de cepas de *S. meliloti*.

- 0,04 % (p/v) Extracto levadura
- 0,1 % (p/v) Manitol
- 0,01 % (p/v) K_2HPO_4
- 0,02 % (p/v) $MgSO_4$
- 0,01 % (p/v) NaCl

Se ajustó el pH a 6,8 adicionando 2M NaOH. El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2% agar bacteriológico.

2.3.3. Luria-Bertani (LB)

El medio LB (Bertani *et al.*, 1951) se usó para el crecimiento de cepas de *E. coli*.

- 1 % (p/v) Triptona
- 0,5 % (p/v) Extracto de levadura
- 1 % (p/v) NaCl

El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2% agar bacteriológico.

2.3.4. SOC

El medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (SOC) (Hanahan, 1983) se usó para la recuperación de células tras una transformación bacteriana.

- 2 % (p/v) Triptona
- 0,5 % (p/v) Extracto de levadura
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM $MgCl_2$
- 10 mM $MgSO_4$
- 20 mM Glucosa

El pH se ajusta a 7 añadiendo 2 M NaOH.

2.3.5. SOB

El medio **de SOB ("Super Optimal Broth")** (Hanahan, 1983) se utilizó para el crecimiento de células para preparación de competentes químicas.

- 2 % (p/v) Triptona
- 0,5 % (p/v) Extracto de levadura
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM $MgCl_2$
- 10 mM $MgSO_4$

El pH se ajustó a 7 añadiendo 2 M NaOH.

2.3.6. TB

El medio Terrific Broth (Sambrook & Russell, 2006) se utilizó como medio de recuperación de células durante el proceso de obtención de células competentes químicamente.

10 mM Piperazina N, N'- bis (2 - etanosulfónico) (PIPES)

15 mM CaCl₂, 250 mM KCl

55 mM MnCl₂.

El pH se ajustó a 6,7 con 2 M KOH. La solución se esterilizó por filtración.

3. Purificaciones de ácidos nucleicos

3.1. Extracción de ADN genómico para genotipado de *M. truncatula*

- 1) Tras 10 días de crecimiento en en turba:vermiculita (3:1) se recogió la primera hoja de cada planta, y se congeló en nitrógeno líquido. Se homogeneizó en frío usando una lanceta de plástico.
- 2) Se añadió a cada muestra 600 µl de tampón de extracción, calentado previamente a 65 °C. Se incubó a 65 °C durante 20 minutos.
- 3) Se añadieron 600 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos.
- 4) La fase acuosa del sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo. A continuación, se adicionaron 500 µl de isopropanol y 50 µl de 3M acetato de sodio pH 5,2. Se mezcló por inversión y se precipita a -20 °C durante 60 minutos.
- 5) Se centrifugó a 15.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70 %.
- 6) Se volvió a centrifugar, esta vez durante 10 minutos. Se eliminó por completo el etanol y se resuspendió en 40 µl de agua libre de DNAsas.
- 7) Se usaron 1-2 µl (10-50 ng) por reacción de PCR de 25 µl volumen final.

Tampón de extracción: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2 % (p/v) CTAB, 1 % (p/v) NaHSO₃

3.2. Extracción de ADN genómico de plantas

Se extrajo ADN genómico mediante el kit DNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (Valencia, CA, USA), con las siguientes modificaciones:

- 1) La extracción se realizó en frío, añadiendo 400 µl de tampón AP1 y 40 µl de RNasaA por cada 100 mg de tejido previamente machacado con ayuda de un mortero.

- 2) Se transfirió a un tubo de 1,5 ml e incubó durante 10 minutos a 65 °C. Se agitó vigorosamente de 2 a 3 veces durante el periodo de incubación.
- 3) Se añadieron 130 µl de tampón P3. Se mezcló por agitación e incubó durante 5 minutos en hielo.
- 4) Se centrifugó durante 5 minutos a 20.000 xg.
- 5) Se pipeteó a una columna QIAshredder encajada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 xg.
- 6) Se transfirió el líquido depositado en el tubo colector a un nuevo tubo, sin alterar el sedimento. Añadir 1,5 volúmenes de tampón AW1, y mezclar por pipeteo.
- 7) Se pipetearon 650 µl de la mezcla en una columna DNeasy Mini encajada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugaron durante 1 minuto a 6.000 xg. Se eliminó el líquido resultante. Se repitió este paso con el resto de la muestra.
- 8) Se cambió la columna a un nuevo tubo colector. Se añadieron 500 µl de tampón AW2, y se centrifugó durante 1 minuto a 6.000 xg. Se eliminó el líquido resultante.
- 9) Se añadieron 500 µl de tampón AW2, y se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 xg. Se transfiere la columna a un nuevo tubo.
- 10) Se añadieron 50 µl de agua MilliQ, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a 6.000 xg.

3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Las colonias de *E. coli* detectadas como positivas se crecieron durante 16 horas en LB con los antibióticos requeridos y a 37 °C. 3 ml de cultivo saturado se centrifugaron 1 minuto a velocidad máxima y se emplearon para la extracción de plásmido, usando el kit NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel (Düren, Alemania). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1) Se añadieron 250 µl de solución A1 al precipitado celular y se resuspendió pipeteando.
- 2) Se añadieron 250 µl de solución A2. Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se añadieron 300 µl de solución A3. Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 xg. El sobrenadante se traspasó a una columna NucleoSpin Plasmid.
- 4) Se centrifugó 1 minuto a 11.000 xg. Se eliminó el líquido resultante de la centrifugación.
- 5) Se adicionaron 600 µl de tampón A4. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 xg. Se eliminó el líquido resultante de la centrifugación.

- 6) Se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 11.000 xg. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- 7) Se añadieron 30 µl de agua. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 xg.

3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras

Las colonias detectadas como positivas se crecieron en 10 ml de medio selectivo SD suplementado con las auxotrofías requeridas, durante 24 horas. Se centrifugó cada muestra, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de agua estéril. El sobrenadante resuspendido se empleó para la obtención de ADN plasmídico:

- 1) Se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se volvió a centrifugar 1 minuto a velocidad máxima.
- 2) Se resuspendieron las células en 0,2 ml de tampón de resuspensión, 0,2 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de bolas de cristal estériles.
- 3) Se agitó vigorosamente la mezcla durante 4 minutos. Se añadió 0,2 ml de TE y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 xg.
- 4) Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml. Se añadió 1 ml de isopropanol y se reposa durante 16 horas a temperatura ambiente.
- 5) Se centrifugó 10 minutos a 10.000 xg y se desechó el sobrenadante. Se lavó el sedimento con 70 % etanol.
- 6) Se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima, se retiró el etanol y se dejó secar el sedimento.
- 7) Se resuspendió en 50 µl de agua MQ.

Tampón genómico: 2 % Tritón X-100 (p/v), 1 % SDS (p/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM Na₂EDTA.

3.5. Extracción de ARN de plantas

La recogida de muestras vegetales para ARN se efectuó entre 3 a 4 horas tras la salida del sol, para minimizar efectos derivados de reloj circadiano y asegurar que la fijación de nitrógeno esté activa. Cada muestra (tejido seleccionado de tres plantas al azar) se congeló en nitrógeno líquido y se guardó individualmente a -80°C para su uso posterior.

- 1) La extracción se realizó en frío, añadiendo 1 ml Tri-Reagent® (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) por cada 50-100 mg de tejido.
- 2) Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se les

- adicionaron 100 µl de cloroformo y tras mezclar por inversión, se volvieron a incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo donde se adiciona 1 µl de glicógeno (concentración final 0,05 µg/µl) y 250 µl de isopropanol.
 - 4) Se dejó precipitar durante 16 horas a -20°C.
 - 5) Se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sedimento se lavó con etanol 75 % (v/v) y se volvió a centrifugar a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C.
 - 6) Se dejó secar el sedimento. Se resuspendió el pellet en 40 µl de agua libre de RNAsas y se incubó durante 5 minutos a 60°C.
 - 7) Se incubó durante 30 minutos a 37°C con **DNA-free DNAsa Turbo™** de Ambion® (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) y RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).
 - 8) Para la limpieza del ARN se utilizó el kit RNeasy® Mini Kit de Qiagen (Valencia, CA, USA) con las modificaciones descritas en los puntos 9 a 14.
 - 9) Se ajustó el volumen a 100 µl con agua libre de RNAsas. Se añadió 350 µl de solución RLT y 3,5 µl de β- mercaptoetanol. Se mezcla todo bien.
 - 10) Se añadieron 250 µl de etanol 100 % y se mezcla por pipeteo. Se transfirió la muestra a las columnas RNeasy Mini y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto.
 - 11) Se eliminó el residuo líquido y se adicionó a la columna 10 µl de DNaseI junto con 70 µl de solución RDD. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 - 12) Se detiene la reacción adicionando 350 µl de solución RW1 y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se elimina el residuo líquido resultante.
 - 13) Se añaden 500 µl de solución RPE a la columna. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. Se elimina el residuo líquido resultante. Se repite este paso de nuevo.
 - 14) Se añaden 30 µl de agua libre de RNAsas y se incubó 5 minutos. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. Para incrementar el rendimiento, se repite este paso una segunda vez.

3.6. Electroforesis no desnaturizante de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos obtenidos se visualizaron en geles de 0,8 - 2 % de agarosa en TBE 1X. Las muestras se tiñeron con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Como tampón de carga se empleó Orange G (6X).

TBE: Tris 0,1M, Ácido Bórico 0,1M y 2 mM EDTA.

Orange G: 0,25 % Orange G, 30 % Glicerol.

3.7. Electroforesis desnaturalizante de ácidos nucleicos

Las muestras de ARN se visualizaron en geles de agarosa-MOPS ((Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico). Cada gel se preparó con 1,2 % (p/v) agarosa en tampón MOPS 1X. Se cargaron 500 ng de ARN por calle junto con tampón de carga 2X. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPS 1x a un voltaje constante de 100 V durante 60 minutos. Las imágenes se tomaron utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

Tampón MOPS 1X: 200 mM MOPS pH7, 50 mM Acetato Sódico, 10 mM EDTA disódico, 2,5 ml formaldehído 37%.

Tampón de carga 2X: 100 µl de formamida, 20 µl MOPS 10X (igual que tampón MOPS 1X, pero 10X más concentrado), 38 µl de formaldehído 37%, 42 µl agua MilliQ, 1 µl Bromuro de Etidio.

3.8. Recuperación de ADN de geles de agarosa

Para purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa se empleó el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel (Düren, Germany). Las bandas a purificar se recortaron desde los geles de agarosa usando un bisturí. Cada muestra se depositó en tubos de 1,5 ml, donde se procedió a su purificación.

4. Síntesis de ADN complementario

Para sintetizar ADNc, 500 ng de cada muestra de ARN se trataron con el kit **PrimeScript™ RT Reagent Kit de TAKARA** (Kusatsu, Shiga, Japan), consistente en:

- 5x PrimeScript™ **Buffer a concentración 1x.**
- **PrimeScript™ RT Enzyme Mix I**, 1U.
- OligodT Primer, concentración final de 25 pM.
- Random 6-mers, concentración final 50 pM.
- Agua libre de RNAsas, hasta 10 µl

Dentro de esta mezcla se añadieron **0,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor** de Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU). La reacción de incubó durante 5 minutos a 37 °C y posteriormente durante 5 segundos a 85 °C. Una vez sintetizado a ADNc, el ARN se eliminó incubando durante 30 minutos a 37°C con 0,5 µl de Ribonuclease H (RNase H) de Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU).

5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.1. PCR no cuantitativa

Las reacciones de PCR no cuantitativa se usaron ante dos circunstancias distintas: amplificación de fragmentos de ADN para clonaje de secuencias, y como método de comprobación o validación de la presencia de una secuencia de ADN en una muestra dada. En todos los casos, como control positivo se empleó como molde 10-20 ng de ADN genómico, y como control negativo una muestra sin ADN. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa como se describe en el apartado 3.8. Los oligonucleótidos empleados en ambos casos se indican en el Anexo I.

5.1.1. PCR no cuantitativa para clonaje

Los fragmentos seleccionados se amplificaron usando la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Esta enzima se caracteriza por poseer alta fidelidad, con una tasa de introducción de errores 50 veces menor que una Taq convencional. En la Tabla 3 se citan las concentraciones de cada componente empleadas, y en la Tabla 4 las condiciones de PCR utilizadas. La temperatura de hibridación es específica de cada pareja de oligonucleótidos empleados, citados en el Anexo I.

Tabla 3: concentraciones de los reactivos de PCR empleados.

Componentes	Taq Phusion®
5x tampón	1x
Mix dNTPs	200 µM
DMSO	3 %
Oligonucleótido 5´	0,2 µM
Oligonucleótido 3´	0,2 µM
Taq Polimerasa	0,5 U
ADN (10-20 ng)	1 µl

Tabla 4: Condiciones estándar de PCR utilizadas.

Nombre del ciclo	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95 °C	1 minuto
Desnaturalización		95 °C	10 segundos
Hibridación	35	50-60 °C	10 segundos
Elongación		72 °C	30 segundos/ Kb
Elongación final	1	72 °C	5 minutos
Mantenimiento	1	12 °C	∞

5.1.2. PCR no cuantitativa para comprobación de fragmentos

Las polimerasas escogidas para este tipo de PCR de comprobación fueron la Taq polimerasa de BIOTOOLS® y la polimerasa DreamTaq® de Thermo (Waltham,

Massachusetts, EEUU). Las mezclas de reacción y condiciones estándares de PCR están descritas en las tablas Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 5: concentraciones de los reactivos de PCR empleados.

Componentes	Taq BIOTOOLS®	DreamTaq®
10x tampón	1x	1x
Mix dNTPs	200 µM	200 µM
Oligonucleótido 5´	0,2 µM	0,2 µM
Oligonucleótido 3´	0,2 µM	0,2 µM
Taq Polimerasa	1 U	1 U
ADN	1 µl	1 µl

Tabla 6: Condiciones estándar de PCR utilizadas.

Nombre del ciclo	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	35	95 °C	30 segundos
Hibridación		55 °C	30 segundos
Elongación		72 °C	30 segundos/ Kb
Elongación final	1	72 °C	5 minutos
Mantenimiento	1	12 °C	∞

Este tipo de PCR es el empleado en PCR de colonia: En sustitución del ADN, cada reacción de PCR utiliza como molde una colonia bacteriana, recogida con una punta estéril.

La comprobación de la segregación de las muestras vegetales hasta la obtención de homocigotos se también usaría esta modalidad de PCR. Cada línea a analizar es sometida a tres rondas de PCR, combinando:

- 1) Los dos oligonucleótidos específicos del transposón (Tnt-1Fw + Tnt-1Rv).
- 2) Un oligonucleótido específico del transposón y uno del gen. Si el transposón se ha insertado en orientación directa, se usarán las combinaciones Gen-Fw + Tnt1-Rv, o Tnt1-Fw + Gen-Rv. Si el transposón se ha insertado en en orientación inversa a la fase de lectura, se usarán las combinaciones Gen-Fw + Tnt1-Fw, o Tnt1-Rv + Gen-Rv.
- 3) Los dos oligonucleótidos específicos de cada gen.

5.2. PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión génica de los diferentes genes analizados se verificó por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), estandarizando la expresión frente al gen de la *ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal (MtUb; Medtr4g077320)* de *M. truncatula* para los genes de la planta y la *dihidrolipoamida S-acetyltransferasa del complejo*

piruvato deshidrogenasa (*PhdB*, *SMc01032*) para los genes de *S. meliloti*. Se utilizó un equipo **StepOnePlus™** Real-Time PCR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU). Cada reacción de PCR se obtuvo usando Power Sybr Green master mix (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) en un volumen final de 10 µl. El programa de PCR se recoge en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas.

Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 minutos
40	95 °C	15 segundos
	60 °C	60 segundos
1	95 °C	15 segundos
	60 °C	60 segundos
	95 °C	15 segundos

Los niveles relativos de transcripción fueron calculados según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) En cada par de oligonucleótidos analizado, se usó un control negativo sin ADNc para descartar posibles contaminaciones.

6. Clonación

6.1 Vectores usados

Los vectores empleados en esta tesis se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8: Vectores usados en esta tesis.

Uso	Nombre	Selección bacteria	Selección planta/levadura	Características	Descrito en
Transformación de <i>M. truncatula</i>	pDONR207	Gm ^R		vector de entrada	
	pGWB1	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, sin tag	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB3	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado gen β-glucuronidasa	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB4	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado a C-terminal GFP	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB5	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del "cauliflower mosaic virus", fusión a GFP en C-terminal	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB6	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del "cauliflower mosaic virus", fusión a GFP en N-terminal	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB13	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado a 3 epítomos HA en el extremo C-terminal	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)

Creación de líneas knock down	pFRN	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, sin tag	NCBI accession number AY310901
Tranformación <i>S. cerevisiae</i>	pYPGE15	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3	Promotor Fosfoglicerato Kinasa 1, sin tag	(Brunelli & Pall, 1993)
	pDR196	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3	Promotor T7, marcador seleccionable lacZ, sin tag	(M.-Y. Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Infiltración de <i>N. benthamiana</i>	PM-CK-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, marcador membrana plasmática en cyan	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
	PM-mcherry-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, marcador membrana plasmática en mcherry	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
	VAC-CK-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, marcador vacuola en cyan	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
	MTC-CK-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, marcador mitocondria en cyan	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
	P19-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, proteína p19 de <i>Tomato bushy stunt virus</i>	(Voinnet <i>et al.</i> , 2003)

6.2. Clonación Gateway

Los fragmentos de PCR purificados, se clonaron por recombinación utilizando el sistema Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). El sistema Gateway® permite translocar fragmentos de ADN desde un vector de entrada a múltiples vectores de destino manteniendo la fase de lectura. Los dos pasos que caracterizan a este proceso se conocen como reacción BP o reacción LR, en función de los sitios att flanqueantes usados en el proceso de recombinación. Como se indica en la Tabla 9, los fragmentos de PCR purificados se clonaron en el vector de entrada pDONR207 usando para su clonaje clonasa BP (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Posteriormente, se utilizó la clonasa LR para la transferencia del fragmento clonado en pDONR207 a los vectores de destino listados en la Tabla 8 (Nakagawa *et al.*, 2007). Cada reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se transforma la mezcla de ligación en *E. coli* DH5α o *A. rhizogenes* ARqua1.

Tabla 9: Reacciones de ligación Gateway

Condiciones	Reacción BP	Reacción LR
Inserto	Producto de PCR purificado (75 ng)	Clon de entrada (75 ng)
Vector	pDONR207 (75 ng)	Vector destino (75 ng)
Mix Enzimas	Clonasa BP (1 µl)	Clonasa LR (1 µl)
Agua	Hasta 5 µl	Hasta 5 µl

6.3. Clonación mediante enzimas de restricción

Se escogieron las enzimas de restricción acordes a las dianas presentadas en el sitio de multiclonación del plásmido a usar. Se descartó que esas dianas estuvieran presentes en la secuencia codificante del gen a clonar. A los oligonucleótidos diseñados para amplificar la secuencia codificante, se les adicionó la diana de restricción para las enzimas de restricción escogidas flanqueando la secuencia, en los extremos 5´ y 3´. Las digestiones de plásmido y fragmento de PCR se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Thermo, Waltham, MA, EEUU), como se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10: Restricción de fragmentos de ADN

Componentes	ADN plasmídico	Producto de PCR
Tampón 10x FastDigest®	1X	1X
ADN	Hasta 1 µg	Hasta 0,2 µg
Enzimas FastDigest® (Thermo)	1 U	1 U
Agua	Hasta 20 µl	Hasta 20 µl

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. El producto de digestión se corrió en geles de agarosa y la banda se extrajo y cuantificó como se detalla en el apartado 3.8. La ligación de fragmentos de ADN digeridos se realizó usando la enzima ADN ligasa T4 (Life Technologies Carlsbad, EEUU) siguiendo un ratio 3:1 (inserto:vector) durante 72 h a 4 °C.

6.4. Clonación por recombinación homóloga

Este método de clonación usa el mecanismo de reparación de ADN de levaduras. Consiste en transformar, siguiendo un ratio 1:3 (sin exceder los 50 ng totales) un vector linealizado con una enzima de restricción y un fragmento obtenido a partir de PCR y purificado (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2005). A este fragmento se le fusionaron por PCR 40 bp a cada lado idénticas al sitio de ligación deseado, que flanqueaban al sitio de restricción usado para linealizar el vector.

7. Transformación

7.1. Transformación de *E. coli*

7.1.1. Transformación química

7.1.1.1. Obtención de competentes

- 1) Se inocularon 250 ml de SOB con 50 µl de cultivo saturado.
- 2) Se incubó a 18 °C en agitación durante 48 horas hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,6 - 0,7. Se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga que se atemperan en hielo durante 15 minutos.

- 3) Se centrifugaron las células 2.500 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se tiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 80 ml de TB. Se incubaron 10 minutos en hielo.
- 4) Se centrifugaron las células de nuevo a 2.500 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de TB. Se incubaron durante 10 minutos en hielo.
- 5) Se dispensaron en tubos de 1,5 ml alícuotas de 400 µl y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservó a -80 °C hasta su utilización.

7.1.1.2. Transformación

Las células, guardadas a -80 °C, se descongelaron en hielo. Cada reacción de transformación contenía la mezcla de 50 µl de células con 10-150 ng de ADN. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, hasta ser sometida a un choque térmico (42 °C durante 1 minuto). Las células se recuperaron en 1 ml SOC (SOB mas 20 mM glucosa, Hanahan *et al.*, 1983) y se incubaron a 37°C durante una hora antes de plaquearlas en LB con los antibióticos requeridos.

7.1.2. Electrotransformación

7.1.2.1. Obtención de células electrocompetentes

Se siguió el protocolo descrito por Ausubel *et al.*, (2005).

- 1) Partiendo de un cultivo saturado de *E. coli*, se inoculó 1 litro de LB a una OD₆₀₀ inicial de 0,2 y se dejó creciendo a 37 °C hasta alcanzar fase exponencial.
- 2) Al llegar a una OD₆₀₀ de 0,6, las células se centrifugaron a 4.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 ml de agua estéril previamente enfriada.
- 3) El paso anterior se repitió tres veces, resuspendiendo en 100 ml de agua estéril fría la primera vez, y en 50 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril las siguientes.
- 4) Se centrifugó una última vez a 4.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, y se resuspendieron las células en 2 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril.
- 5) Se dispensaron las células en tubos de 1,5 ml en alícuotas de 50 µl y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

7.1.2.2. Electroporación

Las células guardadas a -80 °C se descongelaron en hielo. Una alícuota de 50 µl se usó para transformar 10-50 ng de plásmido. La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación y se electroporó a 25 µF de capacitancia, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω en un electroporador ECM630 de BTX. Las células se

recuperaron en 1 ml SOC, incubadas a 37 °C durante 3 horas. Finalmente, se plaquearon en LB con los correspondientes antibióticos.

7.2. Transformación de *Agrobacterium*

7.2.1. Preparación de electrocompetentes

Se siguió el protocolo descrito por Wise *et al.*, (2006)

- 1) Se partió de un cultivo líquido de 5 ml de LB con los antibióticos necesarios, y se inoculó con la cepa de *Agrobacterium*. Se dejó crecer a 28 °C durante 24 horas.
- 2) Desde el cultivo de 5 ml, se inocularon 500 ml de LB suplementado con los antibióticos requeridos, y se dejó creciendo a 28 °C en agitación.
- 3) Al alcanzar OD₅₅₀ 0,5 - 0,8 el cultivo se enfrió a 4 °C.
- 4) Se sedimentaron las células por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron cuidadosamente las células en 10 ml de agua estéril previamente enfriada a 4 °C. Una vez resuspendidas, se ajustó el volumen final de resuspensión a 500 ml.
- 5) Se repitió el paso anterior dos veces, resuspendiendo en volúmenes decrecientes: 250 ml la primera vez, y 50 ml la segunda.
- 6) Se centrifugaron las células a 4.000 xg durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 10 ml de 10 % (v/v) de glicerol estéril enfriado a 4°C.
- 7) Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml en alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su utilización.
- 8) Cada alícuota se usó para transformar de 50 a 200 ng de ADN.

7.2.2. Transformación

Las células guardadas a -80 °C se descongelaron en hielo. Una alícuota de 50 µl se usó para transformar 10-50 ng de plásmido. La mezcla se deposita en una cubeta de electroporación y se electropora a 25 µF de capacitancia, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia **de 200 Ω en un electroporador ECM630 de BTX**. Las células se recuperaron en 1 ml SOC, incubadas a 28 °C durante 3 horas. Finalmente, se plaquearon en LB con los correspondientes antibióticos.

7.3. Transformación de *S. cerevisiae*

Se siguió el método descrito por Schiestl & Gietz (1989).

- 1) Una colonia individual crecida en YPD sólido durante 48 horas, se utilizó para crecer un cultivo líquido de YPD durante 16 horas.
- 2) Desde este cultivo, se inocularon 10 ml de YPD a una densidad inicial de 0,1

- a OD₆₀₀ y se incubó a 28 °C en agitación.
- 3) Al llegar a OD₆₀₀ de 0,4, las células se sedimentaron por centrifugación a 3.000 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución de litio estéril.
 - 4) Se centrifugó 3.000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución de litio estéril.
 - 5) Por cada 60 µl de células se adicionaron 0,07 µg/ml de ADN de esperma de salmón, previamente hervido a 95 °C durante 5 minutos.
 - 6) Cada alícuota preparada sirvió para transformar de 0,1-1 µg de ADN. A cada alícuota de 50 µl de células, se le adicionó la amplificación de PCR y el vector en un ratio 3inserto:1vector (en el caso de recombinación homóloga) o el plásmido cerrado (en el caso de enzimas de restricción) y se agitó vigorosamente.
 - 7) Se adicionó 0,45 ml de solución PEG estéril y se agitó.
 - 8) Se incubaron las células a 30 °C durante 30 minutos.
 - 9) Se les dió un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos.
 - 10) Se plaquearon en SD con los suplementos nutricionales requeridos para las auxotrofías de cada cepa.

Solución PEG: 10 mM tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1 M acetato de litio, 40 % polietilenglicol.

Solución de litio: 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8, 0,1 M de acetato de litio.

7.4. Transformación de *M. truncatula*

Las plantas de *M. truncatula* se transformaron como se describe en Boisson-Dernier *et al.*, (2001). Cada plántula germinada durante 24 horas en oscuridad, debe tener una radícula de aproximadamente 1-2 cm. Se escindió el ápice radicular con un bisturí estéril y el fragmento restante de raíz se arrastró sobre una placa con un césped de la cepa de *A. rhizogenes* que contenía el plásmido a transformar. Cada plántula se transfirió a una placa de Fahreaus (Dazzo, 1982), y se creció a 22 °C y 16 h de luz durante 21-28 días. Tras ese periodo de tiempo, las plantas transformadas se transfirieron a macetas de perlita estéril cuando se utilizaron en ensayos de nodulación, o de arena: vermiculita estéril cuando se utilizaron en ensayos de micorrización.

7.5. Transformación de *N. benthamiana*

La expresión transitoria en *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Voinnet *et al.*, 2003):

- 1) Los transformantes se crecieron en LB con los antibióticos apropiados hasta alcanzar fase exponencial y se centrifugaron a 2.500 xg durante 15 minutos.
- 2) El precipitado se resuspendió en tampón de agroinfiltración hasta alcanzar OD₆₀₀ = 1.
- 3) Las células resuspendidas se incubaron en la solución de agroinfiltración a temperatura ambiente durante 3-5 horas.
- 4) En un paso previo a agroinfiltrar, se mezclaron en proporción (1:1) las siguientes combinaciones: p19 + marcador de orgánulo como control negativo; p19 + marcador de orgánulo + la secuencia codificante de genes de *M. truncatula* previamente clonados en pGWB5 o pGWB6.
- 5) Se infiltraron 20 ml de mezcla de resuspensión por hoja de *N. benthamiana*, con ayuda de una jeringa estéril. Las plantas de *N. benthamiana* utilizadas deben tener 4 semanas.

Solución de agroinfiltración: 10 mM MES pH 5,6, 10 mM MgCl₂ y 150 µM de acetosiringona.

8. Visualización de micorrizas arbusculares

Para la distinción entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, se visualizaron fragmentos de 1 cm de longitud de raíces frescas de *M. truncatula*.

Raíces derivadas de plantas transformadas y marcadas con GFP se observaron en primer lugar con una lupa de fluorescencia Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania). Los fragmentos de 1 cm donde se hubiese observado fluorescencia en la lupa, se separaron mecánicamente con ayuda de un bisturí y se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) un usando el programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

9. Visualización de actividad β-glucoronidasa (GUS)

Raíces y nódulos de *M. truncatula* transformantes de derivados de pGWB3, que fusiona una secuencia aguas arriba del gen de la β-glucuronidasa, se recogieron a los 28 días post inoculación y fueron tratados como se describe en (Vernoud *et al.*, 1999) con ligeras modificaciones:

- 1) Las raíces y nódulos fueron recogidos e incubados en 40 ml de solución GUS al que se le adicionan 20 mg de la sal sódica X-gluc (Sal de ciclohexilamonio del ácido 5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil - beta - D - glucurónico) durante 16 horas.
- 2) Se retiró el exceso de solución y se blanquearonn con NaClO (40 mg/ml) durante 5 minutos. Se lavó el exceso con agua.

- 3) Las imágenes de nódulos fueron tomadas con una lupa de fluorescencia Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).
- 4) Posteriormente, se embebieron los nódulos y las raíces en 6 % (p/v) de agarosa y se cortaron en fragmentos de 100 μ m usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU).
- 5) Las imágenes tomadas con microscopio óptico fueron hechas con un microscopio Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) un usando el programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

Solución GUS: 0,69 % NaH_2PO_4 , 0,2 % EDTA 0,5 M pH 8.0, 0,01 % N-lauril-sarkosina, 0,01 % Triton X-100).

10. Inmunolocalización

Raíces y nódulos de plantas transformadas de *M. truncatula* se recogieron a los 28 días post inoculación y fueron tratadas como sigue:

- 1) Se fijaron en solución de fijación a 4°C durante 16 horas
- 2) Se eliminó el exceso de tampón de fijación y se lavaron las muestras con PBS 1X.
- 3) Posteriormente, se embebieron los nódulos y las raíces en 6 % (p/v) de agarosa y se cortaron en fragmentos de 100 μ m usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU).
- 4) Las secciones se depositaron en portaobjetos de polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), sobre el cual se realizó la histoquímica.
- 5) Las muestras se deshidrataron usando series de metanol al 30%, 50%, 70% y 100% (v/v) en PBS durante 5 minutos y posteriormente, se rehidrataron.
- 6) Para permeabilizar las paredes celulares, se usó 4% (v/v) de celulosa (Onozuka) en PBS durante 1 hora y posteriormente, se trataron con 0,1% (v/v) de Tween 20 durante 15 minutos.
- 7) Las muestras se bloquearon con 5% (w/v) de BSA (albumina de suero bovino) en PBS.
- 8) Las muestras se incubaron con una dilución 1: 400 del anticuerpo primario (en general, en esta Tesis Doctoral fue uno monoclonal anti-HA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) durante dos horas. Los restos de anticuerpo se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X.
- 9) Se incubaron con una dilución 1: 500 del anticuerpo secundario (en esta Tesis, fue un anticuerpo monoclonal anti-ratón de conejo conjugado con Alexa594) resuspendido en PBS 1X durante una hora, y se lavó el exceso 3 veces con PBS1X.

10) Para teñir el ADN, las muestras se incubaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1-5 µg/ ml) durante 15 minutos.

Solución de fijación: 4 % (v/v) paraformaldehído, 2,5 % (v/v) sacarosa en PBS 1X.

PBS1x: 0,8 % NaCl, 0,002 % KCl, 0,0144 % Na₂HPO₄, 0,024 % KH₂PO₄.

Posteriormente, las muestras se observaron en un equipo confocal Leica SP8, visualizadas por un microscopio Leica DMI 6.000 y una lámpara de fluorescencia EL6000 a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). Las muestras se excitaron a 488 nm para el GFP, y 561 nm para el Alexa 594. En el caso del DAPI se empleó el filtro de UV. La fluorescencia emitida se recogió desde 435-500 nm en el caso del DAPI, de 500- 550 nm en el caso de GFP y de 600-650 en el caso del Alexa594. Las imágenes fueron tratadas mediante el programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

Raíces y nódulos derivados de plantas transformadas y marcadas con GFP se observaron en primer lugar con una lupa de fluorescencia Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania). En el caso de plantas noduladas, se embebieron los nódulos y las raíces en 6 % (p/v) de agarosa y se cortaron en fragmentos de 100 µm usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU). Posteriormente, se observaron en un equipo confocal Leica SP8, visualizados por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000 a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). La muestra se excitó a 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió a 500-550 nm.

Las muestras de hojas de *N. benthamiana* resultantes de agroinfiltración se escindieron en fragmentos de 0,5 cm y se observaron en un equipo confocal Leica SP8, visualizadas por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000 a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). Las muestras se excitaron a 488 nm para el GFP y UV para cyan. La fluorescencia emitida se recogió desde 450-490 nm en el caso del cyan y 500- 550 nm en el caso de GFP.

Las imágenes fueron tratadas mediante el programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Cuando la imagen se compone de varios planos en el eje Z, todos los planos obtenidos en la captura de una imagen, se solaparon usando el parámetro Max Intensity. Las imágenes obtenidas de cada láser se superpusieron usando la opción Merge Image. Posteriormente la imagen se montó usando Adobe Illustrator.

11. Determinación del contenido de metales

Para la determinación del contenido en metales, muestras de plantas de 28 dpi se enviaron al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid para un análisis de Fluorescencia de Rayos X por

Reflexión Total (TXRF), o bien a la Unidad de Análisis de Metales de la Universidad de Barcelona, para medida de Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

12. Localización de la distribución de metales

12.1. Localización de la distribución de hierro

Raíces y nódulos de plantas de *M. truncatula* se recogieron a los 28 días post inoculación y fueron tratadas como sigue:

- 1) Se efectuaron secciones de 100 μm en seco, usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU).
- 2) Las secciones se depositaron en portaobjetos de vidrio y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en volúmenes equivalentes de 4% (v/v) HCl y 4 % (v/v) de ferrocianuro potásico (Solución Perls).
- 3) Se retiró el exceso y se lavaron las muestras tres veces con agua destilada.
- 4) Se incubaron las muestras con una solución de 10 mM NaN_3 en metanol y 0,3 % (v/v) de H_2O_2 durante una hora.
- 5) Se retiró el exceso y se lavan las muestras 3 veces con 0,1 M de tampón fosfato sódico pH 7,4.
- 6) Posteriormente se incubaron con 0,025 % (v/v) de 3, 3'-Diaminobenzidina (DAB), 0,005 % (v/v) H_2O_2 , y 0,005 % (v/v) CoCl_2 en 0,1 M tampón fosfato sódico pH 7,4 durante 15 minutos para amplificación de la señal.
Se realizaron tres lavados con agua destilada para detener la reacción.
- 7) Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot.

12.2 Localización de la distribución de zinc

La distribución de zinc fue deducida usando el fluoróforo previamente descrito Zinpyr-1 (Sinclair *et al.*, 2007), con ciertas modificaciones:

- Los nódulos empleados se seccionaron a mano y se incubaron con 200 μM de Zinpyr-1 en PBS durante 15 minutos en la oscuridad, y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS.
- La señal de Zinpyr fue observada con un microscopio confocal Leica SP8 usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión entre 500-550 nm.

12.3. Localización de la distribución de cobre

Para la estimación del contenido de cobre se utilizó el fluoróforo Coppersensor-1 (CS1) (Zeng *et al.*, 2006). La distribución de cobre se estimó basándose en los parámetros descritos en (Bernal *et al.*, 2012), con ligeras modificaciones:

- Los nódulos de plantas recogidas a 28 dpi se seccionaron longitudinalmente con la ayuda de un bisturí.
- Éstos se tiñeron con 10 μ M CS1 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- Estas secciones se observaron en un microscopio confocal Leica SP8 usando excitación a 488 nm y recogiendo la señal entre 564 y 600 nm.

13. Medida de actividad nitrogenasa

Las medidas de actividad nitrogenasa se realizaron por medio del ensayo de reducción de acetileno, basado en el descrito por Hardy *et al.*, (1968).

- 1) Cada línea a analizar se introdujo en viales de 30 ml cerrados con tapones de goma. Cada vial se llenó con las raíces y nódulos de 5 plantas de 28 dpi al azar.
- 2) Un décimo del volumen de aire del vial se reemplazó por su correspondiente volumen de acetileno.
- 3) Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante media hora.
- 4) Se tomaron muestras de 0,5 ml y se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-8, con una columna Porapak N. La medida de etileno se determinó midiendo la altura del pico de etileno respecto de la línea base.
- 5) La medida de actividad nitrogenasa se representó en nmol de etileno por hora y gramo de nódulo/ número de plantas, calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad nitrogenasa} = \frac{Cst \text{ (nmol)} \times Metst \text{ (mV)} \times Vt \text{ (ml)}}{Metmuestra \text{ (mV)} \times mnod \text{ (g)} \times Vmuestra \text{ (ml)}}$$

Donde,

Cst = Concentración del estándar

Metst = Medida de etileno para el estándar

Vt = Volumen total del vial utilizado

Metmuestra = Medida de etileno para una muestra

mnod = masa de nódulos

Vmuestra = Volumen de muestra medido

14. Actividad citocromo oxidasa

Con este ensayo se midió la actividad citocromo oxidasa de bacteroides de *S. meliloti* obtenidos desde nódulos. Se partió de una suspensión de bacteroides

obtenidos de plantas de 4 semanas post inoculación.

- 1) Para obtener bacteroides, se escindieron los nódulos de las raíces hasta alcanzar un peso de 0,1-0,3 gramos.
- 2) Se les añadió 1/3 del peso de poli vinil polipirrolidona (PVPP) y se homogenizaron.
- 3) Se les añadió 1 ml de tampón de extracción y se centrifugó 1 minuto a 170 xg.
- 4) El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Esta operación se repitió dos veces, juntando los sobrenadantes.
- 5) La mezcla de sobrenadantes se volvió a centrifugar 10 minutos a 4.200 xg. El pellet se resuspendió en un tampón de resuspensión.

Tampón de extracción: 38 mM H_2HPO_4 , 24 mM KH_2PO_4 y 2,4 mM MgCl_2 pH 6,9

Tampón de resuspensión: 50mM HEPES y 200 mM NaCl, pH7.

La suspensión con bacteroides se utilizó para determinar la actividad citocromo oxidasa, añadiendo 5 μl de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD) 0,54 M a cada muestra y monitorizando la absorbancia a DO_{520} cada 10 segundos hasta un máximo de 5 minutos. Como blanco se utilizó el tampón de resuspensión sin células. La actividad COX se refiere como la cantidad de TMPD oxidado por unidad de tiempo y **cantidad de proteína (nmol / h·mg)**. Para calcularlo, se corrigió la pendiente de la recta de las medidas de Absorbancia a 520 nm, tomadas cada 10 segundos durante 5 minutos, restándolas de esa misma medida pero para el blanco. Posteriormente, se calculó la cantidad de TMPD que habría reaccionado por hora aplicando la ley de Beer-Lambert para este compuesto. Finalmente, se ajustó la medida a la cantidad de proteína estimada para un volumen de la muestra equivalente al usado.

15. Extracción de proteínas

Se partió de plantas de *M. truncatula* a los 28 dpi, de las que se escindieron los nódulos. Los nódulos de al menos 15 plantas se trituraron con ayuda de un mortero y resuspendieron en 1 ml de 50 mM TrisHCl pH 7,5 con 1 mM de Fluoruro de Metilfenilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas.

16. Determinación de proteínas

Para cuantificar el contenido en proteínas de una muestra, se incubaron 50 μl esa muestra con 10 % SDS durante 5 minutos a 95°C. El contenido proteico de 50 μl de la mezcla se estimó utilizando **el kit Pierce™ BCA Protein Assay de Thermo Scientific** (Waltham, Massachusetts, EEUU), midiendo la absorbancia a DO_{562} y

comparando frente a una recta patrón con distintas concentraciones de BSA. La cuantificación de proteínas por ácido bicinonínico (BCA) se basa en una reacción colorimétrica, en la cual el BCA es capaz de unirse a moléculas de Cu^+ , generando un compuesto coloreado que absorbe luz a DO_{562} . La cantidad de moléculas de Cu^+ en la muestra será proporcional a la cantidad de proteína en la misma.

17. Western blot

17.1. Electroforesis de proteínas y tinción del gel.

La desnaturalización de las proteínas se llevó a cabo mezclando el extracto con tampón de carga, hirviendo las muestras a 90°C durante 5 minutos. A continuación, $30\text{ }\mu\text{g}$ de las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS – PAGE), preparados con una zona de enfoque (al 4%) y una zona de separación (al 12%).

Gel condensador: 4 % (p/v) acrilamida-bisacrilamida, 0,25 M TrisHCl, 0,2 % (v/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,04 % (v/v) Persulfato amónico (APS). Ajustar a pH 6,8.

Gel separador: 12 % (p/v) acrilamida-bisacrilamida, 0,4 M TrisHCl, 0,1 % (p/v) SDS, 0,0004 % (v/v) TEMED, 0,2 % (p/v) Persulfato amónico (APS). Ajustar a pH 8,8.

Tampón de carga: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, **5 % (p/v)**, **2 % β -mercaptoetanol**, 20 % glicerol (v/v), 0,2 % (p/v) azul de bromofenol.

La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad, Hercules, CA, EEUU), usando tampón para electroforesis desnaturalizante (0,025 M Tris, 0,192 M Glicina, 0,1 % (v/v) SDS), a 120 V (voltaje constante) durante 1 a 2 horas. A continuación, los geles se usaron para transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior detección por Western Blot, o se tiñeron con Coomassie siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Se incubó el gel con solución fijadora durante 30 a 60 minutos en agitación. Verter al final.
- 2) Se incubó con una solución 0,1 % (p/v) de Coomasie Blue G250 en 10% ácido acético durante 16 horas. Descartar el exceso.
- 3) Se decoloró usando una solución 5 % (v/v) ácido acético y 20 % (v/v) metanol hasta que se eliminó el exceso de Coomasie. Se repitió si fuese necesario.

17.2. Electrotransferencia de proteínas

Una vez separadas por SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ usando el sistema Mini Trans® Blotter (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Para ello el gel se incubó en tampón de transferencia

durante 30 minutos y a continuación se transfirió durante 45-60 minutos a 20-25 V amperaje/voltaje constante.

Para confirmar la presencia de proteínas en la membrana tiñéndola con rojo Ponceau durante 5 minutos. La membrana se destiñó con tampón de lavado (229).

Tampón de transferencia: 25 mM Tris, pH 9,3, 192 mM glicina, 0,375 % SDS (v/v) y 20 % (v/v) metanol.

Rojo Ponceau: 0,1 % (v/v) Ponceau S, 5 % (v/v) ácido acético.

Tampón de lavado: 50 mM Tris pH 7.4, 0,2M NaCl.

17.3. Immunodetección de proteínas

La membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas se bloqueó con 5 % BSA/leche desnatada en polvo preparado en 50 mM Tris pH 7.4, 0,2M NaCl (tampón 229). A continuación, se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti-NifH (desarrollado por el laboratorio del Dr. Luis Rubio) preparado a una concentración 1:2500 en tampón 229 con 5 % BSA. El anticuerpo primario se incubó durante 16 horas en agitación a 4° C. A continuación, se realizaron tres lavados con tampón 229, y posteriormente, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina a una concentración 1:1000 en tampón 229 con 5 % BSA. La membrana se lavó de nuevo tres veces con tampón 229 y a continuación se reveló la actividad fosfatasa alcalina. La membrana se incubó en tampón 229 con 0,05 % (v/v) de azul de nitrotetrazolio (NBT) y 0,02 % (v/v) de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), ambos disueltos en dimetilformamida, hasta la aparición de la banda correspondiente, y posterior detención de la reacción lavando con agua.

Tampón de lavado (229): 50 mM Tris pH 7.4, 0,2M NaCl.

18. Bioinformática

18.1. Comparación de secuencias

Para identificar miembros de las familias de transportadores de metales, se realizaron búsquedas tipo BLASTN y BLASTX en el *M. truncatula* Genome Project site (<http://www.jcvi.org/medicago/index.php>). Las secuencias de proteínas homólogas a las objeto de estudio en otros organismos son las siguientes:

1) Para MtCOPT1 y MtCOPT2:

Nombre	Organismo	Número de Acceso	Sustrato
MtCOPT1	<i>M. truncatula</i>	Medtr4g019870	Cu ⁺
MtCOPT2		Medtr7g066070	Cu ⁺
MtCOPT3		Medtr3g105330	

MtCOPT4		Medtr4g064963	
MtCOPT5		Medtr4g065660	
MtCOPT6		Medtr1g015000	
MtCOPT7		Medtr4g065123	
MtCOPT8		Medtr0027s0220	
AtCOPT1	<i>A. thaliana</i>	At5g59030	Cu ⁺
AtCOPT2		At3g46900	Cu ⁺
AtCOPT3		At5g59040	
AtCOPT4		At2g37925	
AtCOPT5		At5g20650	Cu ⁺
AtCOPT6		At2g26975	Cu ⁺
OsCOPT1	<i>O. sativa</i>	Os01g56420	
OsCOPT2		Os01g56430	Cu ⁺
OsCOPT3		Os03g25470	Cu ⁺
OsCOPT4		Os04g33900	Cu ⁺
OsCOPT5		Os05g35050	
OsCOPT6		Os08g35490	Cu ⁺
OsCOPT7		Os09g26900	Cu ⁺
BdCOPT1	<i>B. distachion</i>	Bradi1g24180	
BdCOPT2		Bradi1g24190	
BdCOPT3		Bradi2g51210	Cu ⁺
BdCOPT4		Bradi4g31330	Cu ⁺
BdCOPT5		Bradi5g09580	Cu ⁺
GmCOPT1	<i>G. max</i>	Glyma_11g134700	
GmCOPT2		Glyma_18g191300	
GmCOPT3		Glyma_04g057000	
GmCOPT4		Glyma_06g057400	
GmCOPT5		Glyma_01g106700	
GmCOPT6		Glyma_07g141200	
GmCOPT7		Glyma_07g141600	
GmCOPT8		Glyma_14g107100	
GmCOPT9		Glyma_17g219400	
GmCOPT10		Glyma_18g191900	
PvCOPT1	<i>P. vulgaris</i>	PHAVU_011g060400g	
PvCOPT2		PHAVU_011g060500g	
PvCOPT3		PHAVU_008g112800g	
PvCOPT4		PHAVU_009g083400g	
PvCOPT5		PHAVU_008g113200g	
PvCOPT6		PHAVU_009g083400g	
SICOPT1	<i>S. lycopersicum</i>	Solyc02g082080	
SICOPT2		Solyc09g014870	
SICOPT3		Solyc06g005820	
SICOPT4		Solyc08g006250	
SICOPT5		Solyc10g084980	
SICOPT6		Solyc01g107640	
SICOPT7		Solyc09g011700	
SICOPT8		Solyc06g005620	
PtCOPT1	<i>P. trichocarpa</i>	POPTR_0009s04370g	
PtCOPT2		POPTR_0001s25290g	

PtCOPT3	POPTR_0009s04360g
PtCOPT4	POPTR_0006s09440g
PtCOPT5	POPTR_0006s23580g
PtCOPT6	POPTR_0006s14310g
PtCOPT7	POPTR_0006s09430g

2) Para MtMTP2:

Nombre	Organismo	Número de Acceso	Sustrato
MtMTP1	<i>M. truncatula</i>	Medtr8g024240	Zn
MtMTP2		Medtr4g064893	Zn
MtMTP3		Medtr2g036390	
MtMTP4		Medtr3g080090	
MtMTP5		Medtr7g093290	
MtMTP6		Medtr1g088870	
MtMTP7		Medtr4g008150	
MtMTP8		Medtr3g062610	
MtMTP9		Medtr2g064405	
MtMTP10		Medtr8g046550	
MtMTP11		Medtr7g022890	
MtMTP12		Medtr6g463330	
MtMTP13		Medtr5g075680	
AtMTP1	<i>A. thaliana</i>	At2g46800	Zn
AtMTP2		At3g61940	
AtMTP3		At3g58810	Zn
AtMTP4		At2g29410	
AtMTP5		At3g12100	Zn
AtMTP6		At2g4783	
AtMTP7		At1g51610	
AtMTP8		At3g58060	Mn
AtMTP9		At1g79520	
AtMTP10		At1g16310	
AtMTP11		At2g39450	Mn
AtMTP12		At2g04620	Zn
OsMTP1	<i>O. sativa</i>	Ay266290	Zn
OsMTP8		Ap014959	Mn
CsMTP1	<i>Cucumis sativus</i>	Ef684941	Zn
CsMTP4		Jq618097	Zn
CsMTP8		Jq618099	
CsMTP9		Jq618098	Mn
AhMTP1-A	<i>A. halleri</i>	Aj556183	Zn
AhMTP1-B		Fn386317	Zn
AhMTP1-C		Fn386316	Zn
AhMTP1-D		Fn386315	Zn
HvMTP1		Am286795	Zn
HvMTP8.1		Jx051321	Mn
PtdMTP1	<i>P. trichocarpa x deltoides</i>	Ay450453	Zn
PtMTP11.1	<i>P. trichocarpa</i>	Ef453693	Mn

PtMTP11.2	Ef453694	Mn
-----------	----------	----

1) ParaMtZIP6:

Nombre	Organismo	Número de Acceso	Transporta
MtZIP1	<i>M. truncatula</i>	Medtr2g064310	Zn
MtZIP2		Medtr2g097580	
MtZIP3		Medtr3g081580	Zn
MtZIP4		Medtr3g082050	Mn
MtZIP5		Medtr1g016120	Fe, Zn
MtZIP6		Medtr4g083570	Fe, Zn
MtZIP7		Medtr3g058630	Mn
MtZIP8		Medtr2g098150	
MtZIP9		Medtr3g081640	
MtZIP10		Medtr3g081690	
MtZIP11		Medtr3g104400	
MtZIP12		Medtr4g065640	
MtZIP13		Medtr5g071990	
MtZIP14		Medtr6g007687	
MtZIP15		Medtr7g074060	
MtZIP16		Medtr8g105030	
AtZIP1	<i>A. thaliana</i>	At3g12750	Zn, Mn
AtZIP2		At5g59520	Zn, Mn, Cu
AtZIP3		At2g32270	Zn
AtZIP4		At1g10970	Zn, Cu
AtZIP5		At1g05300	Mn
AtZIP6		At2g30080	Mn
AtZIP7		At2g04032	Fe, Zn, Mn
AtZIP8		At5g45105	
AtZIP9		At4g33020	Mn
AtZIP10		At1g31260	
AtZIP11		At1g55910	Zn
AtZIP12		At5g62160	Zn
AtIRT1		At4g19690	Fe, Mn, Cd
AtIRT2		At4g19680	Fe, Zn
AtIRT3		At1g60960	Fe, Zn
AtIAR1		At1g68100	
AtZPT29		At3g20870	Zn
AtPutZnT		At3g08650	
OsZIP1	<i>O. sativa</i>	Os01g74110	Zn
OsZIP2		Os03g29850	
OsZIP3		Os04g52310	Zn
OsZIP4		Os08g10630	
OsZIP5		Os05g39560	Zn
OsZIP6		Os05g07210	
OsZIP7		Os05g10940	Fe
OsZIP8		Os07g12890	Zn
OsZIP9		Os05g39540	

OsZIP10		Os06g37010	
OsZIP11		Os05g25194	
OsZIP13		Os02g10230	
OsZIP14		Os08g36420	Zn
OsZIP16		Os08g01030	
OsIRT1		Os03g46470	Fe, Zn, Cd
OsIRT2		Os03g46454	Fe, Zn, Cd
ZmZIP1	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G001803	Fe, Zn
ZmZIP3		GRMZM2G045849	Fe, Zn
ZmZIP5		GRMZM2G064382	Fe, Zn
ZmZIP6		GRMZM2G034551	Fe, Zn
ZmZIP7		GRMZM2G015955	Fe, Zn
ZmZIP8		GRMZM2G093276	Fe, Zn
PvZIP1	<i>P. vulgaris</i>	Phvul.001G035800	
PvZIP4		Phvul.002G184200	
PvZIP5		Phvul.005G048900	
PvZIP6		Phvul.005G145900	
PvZIP7		Phvul.005G146000	
PvZIP8		Phvul.005G149800	
PvZIP9		Phvul.006G001000	
PvZIP11		Phvul.006G003300	
PvZIP12		Phvul.006G055800	
PvZIP13		Phvul.006G070200	
PvZIP14		Phvul.008G079500	
PvZIP15		Phvul.008G259200	
PvZIP16		Phvul.008G290500	
PvZIP17		Phvul.010G059200	
PvZIP18		Phvul.011G058500	
PvZIP19		Phvul.002G099700	
PvIRT1		Phvul.003G262400	
PvIRT2		Phvul.003G262500	
PvIRT3		Phvul.009G077700	
PvZIPT		Phavu.Phvul. L002700	
GmZIP1	<i>G. max</i>	Glyma.20G063100	
PslIRT1	<i>Pisum sativum</i>	AF065444	
LeIRT1	<i>S. lycopersicum</i>	AF136579	
ScZRT1	<i>S. cerevisiae</i>	NP_011259	

Los árboles filogenéticos se construyeron del siguiente modo: se compararon las secuencias proteicas usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), posteriormente se analizaron mediante MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013) empleando un algoritmo tipo Neighbour Joining. La visualización de los árboles se generó mediante FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

18.2. Diseño oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en esta tesis, se diseñaron con ayuda de las

siguientes herramientas bioinformáticas:

1) Descarga de secuencias

De *M. truncatula* bv A17 (<http://www.jcvi.org/medicago/>)

De *M. truncatula* bv R108 (<http://www.medicagohapmap.org>)

De *S. meliloti* (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/Sinorhizobium>)

2) Análisis de secuencias

Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)

Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

4 Peaks (<http://nucleobytes.com/4peaks/>)

3) Diseño y análisis de oligonucleótidos

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Primer3Plus (<http://primer3.ut.ee>)

Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

18.3. Otras herramientas

1) Análisis de transcritos de *S. meliloti* y *M. truncatula*

Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>)

2) Predicción de topología y dominios proteicos

Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>)

RESULTADOS

————— MtCOPT1 —————

Para poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno, el nódulo demanda gran cantidad de metales, entre ellos el cobre. Este metal no interviene en la fijación de nitrógeno como cofactor de la nitrogenasa, pero forma parte de la citocromo oxidasa *cbb3* encargadas de proveer de energía a la nitrogenasa (Preisig *et al.*, 1996), y de Cu/Zn superóxido dismutasas que detoxifican radicales libres (Rubio *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2004). De hecho, la deficiencia de cobre en suelos reduce la actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos (Hallsworth, 1960; Seliga, 1993; Snowbal *et al.*, 1980). Al igual que ocurre con el hierro, se hipotetiza que el cobre viaja por los haces vasculares desde la raíz al nódulo y se libera en el apoplasto de la zona de infección/diferenciación de los nódulos de tipo indeterminado (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013). Para llegar a los simbiosomas, el cobre debe franquear primero la membrana plasmática de las células infectadas del nódulo. Este paso puede estar mediado por transportadores de la familia YSL (Zheng *et al.*, 2012), si el cobre aparece unido a NA, o por transportadores COPT (Sancenón *et al.*, 2003), si el cobre se encuentra en forma iónica. Dado que se ha descrito que el hierro se incorpora a las células infectadas desde el apoplasto en forma Fe^{2+} (Tejada-Jiménez *et al.*, 2015), sin estar asociado a NA, cabría esperar que el cobre exhibiera un comportamiento similar, introduciendo Cu^+ y no Cu-NA al citoplasma las células infectadas. De este modo, cabría esperar la existencia de transportadores de la familia COPT implicados en la homeostasis de cobre en los nódulos.

MtCOPT1 es específico de nódulo

Partiendo de la hipótesis en que los transportadores de la familia COPT podrían estar implicados en el transporte de cobre al interior de las células del nódulo, se examinó el genoma de *M. truncatula* (<http://www.jcvi.org/medicago/>) en busca de genes con alta similitud a transportadores COPT/Ctr de plantas. Se encontraron 8 genes: (*MtCOPT1*, *Medtr4g019870*; *MtCOPT2*, *Medtr7g066070*; *MtCOPT3*, *Medtr3g105330*; *MtCOPT4*, *Medtr4g064963*; *MtCOPT5*, *Medtr4g065660*; *MtCOPT6*, *Medtr1g015000*; *MtCOPT7*, *Medtr4g065123*; y *MtCOPT8*, *Medtr0027s0220*). Cuando se compararon con secuencias proteicas de COPT de especies monocotiledóneas (*O. sativa* y *B. distachion*) y dicotiledóneas (*A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *S. lycopersicum*, *G. max* y *P. vulgaris*), se observó una distribución similar a la de otros árboles de la familia COPT previamente publicados (Jung *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015), diferenciándose dos clados (Figura 12).

Figura 12: MtCOPT1 es un miembro de la familia COPT. Árbol de las proteínas transportadoras tipo COPT de *M. truncatula* comparadas con sus homólogos en otras especies vegetales.

En uno de ellos, un subclado agrupaba exclusivamente a proteínas de monocotiledóneas. A lo largo del segundo clado se encontraban las proteínas COPT de *M. truncatula*, separadas en tres grupos: en el primer grupo, se encontraron MtCOPT4, MtCOPT5 y MtCOPT7; en el segundo, se situaban MtCOPT1 y MtCOPT2; y finalmente en el tercero se encontró únicamente la proteína MtCOPT8.

Con el fin de establecer una posible conexión entre los transportadores COPT de *M. truncatula* y la FSN, se llevó a cabo un análisis por PCR cuantitativa a tiempo real, de la expresión de los 8 genes de *M. truncatula* (Figura 13). Ésta se determinó en raíces y partes aéreas de plantas no inoculadas, y en raíces, partes aéreas, y nódulos de plantas inoculadas con *S. meliloti* 2011. Para compensar por la acción del nódulo, las plantas no inoculadas fueron fertilizadas con nitrato amónico como se indica en la sección 1 de materiales y métodos. De los 8 transportadores analizados, *MtCOPT1* fue el gen con mayor expresión en nódulo y el único expresado exclusivamente en él (Figura 13). La proteína más cercana en el árbol a *MtCOPT1* es *MtCOPT2*, compartiendo entre ambas un 58 % de identidad. A pesar de eso, no se detectaron transcritos de MtCOPT2 en ninguna de las condiciones testadas (Figura 13). Sin embargo, otros dos genes con menor grado de similitud presentaban expresión en nódulo, pero a menor nivel que MtCOPT1: *MtCOPT5* se expresaba en raíz tanto de plantas fertilizadas como inoculadas, y nódulo; y *MtCOPT3* se expresaba de forma ubicua, tanto en parte aérea como en raíz y nódulos, e independientemente de las condiciones analizadas. *MtCOPT3* y *MtCOPT6* se expresaron con mayor intensidad en parte aérea e independientemente de si la planta estaba inoculada o fertilizada con nitrato amónico. De los otros dos miembros de la familia en *M. truncatula*, *MtCOPT4* solo se expresa en parte aérea mientras que *MtCOPT8* solo se expresa en raíz (Figura 13).

Figura 13: Expresión en partes aéreas, raíces y nódulos de los miembros de la familia COPT de *M. truncatula*. Expresión en condiciones de simbiosis con *S. meliloti*, o sin inocular, pero fertilizados con nitrógeno. Datos relativizados a la expresión estándar del gen constitutivo Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa 1. Cada valor es la media de tres experimentos independientes $\pm$ SD. Los transcritos de MtCOPT2 y MtCOPT7 no se detectaron en las condiciones descritas.

MtCOPT1 transporta cobre hacia el citoplasma

Todos los transportadores de COPT/Ctr identificados hasta el momento facilitan el transporte de Cu^+ hacia el citosol y comparten ciertas características conservadas en su estructura (Dumay *et al.*, 2006; Sancenón *et al.*, 2003). Como se indicó en la introducción, estas proteínas poseen tres dominios transmembrana (TMD) y un motivo conservado $\text{Mx}_3\text{Mx}_{12}\text{Gx}_3\text{G}$ entre los dominios TMD2 y TMD3 (Puig *et al.*, 2002; De Feo *et al.*, 2009), quedando la región C- terminal en el citoplasma. La predicción bioinformática generada sobre la topología de la proteína MtCOPT1, cumple todos los parámetros estructurales previamente citados (Figura 14A). Esta predicción permitiría hipotetizar que MtCOPT1, tendría el mismo sustrato y dirección de transporte que el del resto de proteínas COPT (Sancenón *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2011); es decir, MtCOPT1 actuaría como transportador de membrana implicado en la transferencia de cobre hacia el citoplasma.

Figura 14: MtCOPT1 transporta cobre hacia el citosol. A) Topología de MtCOPT1. Resaltado en rojo está el motivo MxxxM y en verde el motivo GxxxG , altamente conservados en proteínas COPT. B) La cepa parental BY4741 se transformó con pYPEG15, mientras que la mutante Δctr1 se transformó tanto con el vector vacío pYPEG15 como con pYPEG15 conteniendo la secuencia codificante de MtCOPT1. Diluciones seriadas de cada transformante se plaquearon en medio no selectivo (YPD), medio selectivo YPEG y medio selectivo suplementado con 1 mM CuSO_4 .

Para comprobarlo, se realizaron ensayos de complementación heteróloga en mutantes de *S. cerevisiae*. Para ello, en primer lugar, la secuencia codificante de *MtCOPT1* se clonó en el vector pYPGE15 bajo el control del promotor constitutivo de la *fosfoglicerato quinasa* de *S. cerevisiae*. Esta construcción se introdujo en una cepa de *S. cerevisiae* cuyo gen *ScCTR1* estaba deletado (Dancis *et al.*, 1994). Este mutante, $\Delta ctr1$, carecía de su sistema principal de captación de cobre del medio (Dancis *et al.*, 1994). Esta deficiencia impediría que el complejo enzimático de la citocromo c oxidasa funcionara correctamente, dado que el cobre es un factor esencial del mismo (Tsukihara *et al.*, 1995). Esto a su vez impediría la realización de la respiración oxidativa, lo que imposibilitaría su crecimiento en medios con fuentes de carbono no fermentables como glicerol o etanol (Dancis *et al.*, 1994). El crecimiento de la cepa $\Delta ctr1$ en YPEG (con glicerol y etanol como única fuente de carbono) puede ser rescatado al suplementar el medio con una fuente exógena de cobre, o con la expresión de un transportador funcionalmente equivalente a ScCTR1.

Diluciones seriadas de la cepa $\Delta ctr1$ transformada con *MtCOPT1*, se plaquearon en YPEG, YPEG suplementado con 1mM CuSO₄, e YPD (Figura 14B). Como control negativo se usó la misma cepa $\Delta ctr1$ con el plásmido vacío pYPGE15, y como control positivo la cepa parental BY4741 también transformada con el plásmido vacío. La expresión de *MtCOPT1* en el fondo $\Delta ctr1$ restableció la capacidad respiratoria del mutante al mismo nivel que el silvestre dado que al ser plaqueados en el medio YPEG sin cobre, ambos presentaron la misma capacidad de crecimiento.

MtCOPT1 se expresa a lo largo de las zonas de diferenciación y fijación de los nódulos

Para determinar la localización de la transcripción de *MtCOPT1* a nivel tisular, se fusionó el promotor de *MtCOPT1* al gen de la β -glucuronidasa (GUS). Se consideró como promotora la región de 2 kb localizada aguas arriba del codón de inicio. Esta construcción se introdujo por transformación con *A. rhizogenes* en plántulas de *M. truncatula*. Las plantas transformadas fueron transferidas a macetas con perlita como sustrato e inoculadas con una solución saturada de *S. meliloti*. A los 28 días post inoculación se analizó la actividad GUS. La localización tisular de la expresión de *MtCOPT1* se identificó a lo largo de las zonas de infección-diferenciación y el comienzo de la zona de fijación, con un máximo de expresión en la región que podría corresponderse con la Interzona (Figura 15A). Cortes longitudinales de estos nódulos mostraban con mayor precisión la localización de la expresión de *MtCOPT1* en zona II y principio de zona III (Figura 15B). Este patrón de expresión tisular se correspondía con los datos transcriptómicos de células microdisecionadas de las distintas zonas del nódulo, disponibles en la base de datos Symbimics (Figura 15C)

(Roux *et al.*, 2014). Así se observaba que la expresión de *MtCOPT1* a lo largo de las regiones del nódulo comenzaba en zona II y experimentaba un incremento hasta interzona, tras lo cual volvía a disminuir en zona III.

Figura 15: *MtCOPT1* se expresa en las zonas de diferenciación y fijación del nódulo. A) Detección de la actividad GUS de nódulos de *M. truncatula* expresando el gen de la β -glucuronidasa bajo el control del promotor de *MtCOPT1*. Barra de escala = 300 μ m. B) Sección longitudinal de un nódulo de *M. truncatula* que expresa el gen de la β -glucuronidasa bajo el control del promotor de *MtCOPT1*. Barra de escala = 100 μ m. C) Expresión de *MtCOPT1* en nódulos de *M. truncatula*. Los datos de la expresión han sido recogidos en la base de datos Symbimics. (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>). Las leyendas significan ZI: Zona I; ZIId, Zona II distal; ZIIp, zona II proximal; IZ- interzona; ZIII, Zona III.

Para confirmar que esta expresión no es fruto de actividad glucuronidasa inespecífica, se transformaron plantas de *M. truncatula* con la misma región promotora, pero esta vez fusionada a GFP. Las plantas transformadas se transfirieron a macetas con perlita y se inocularon con una cepa de *S. meliloti* con expresión constitutiva de DsRED. Los nódulos recogidos fueron cortados en secciones transversales de 100 μ m de grosor y teñidos con DAPI para facilitar la determinación de la zonación del nódulo. Al igual que lo observado por actividad GUS, la señal recogida con el marcaje con GFP comenzaba en zona II y continuaba hasta zona III (Figura 16).

Figura 16: Localización tisular de la expresión de MtCOPT1. Se fusionó el promotor de MtCOPT1 con GFP (verde, panel superior izquierdo). Las plantas se inocularon con *S. meliloti* expresando constitutivamente DsRED (rojo, panel superior derecho). El ADN se marcó con DAPI (azul, panel inferior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron junto con la imagen del mismo nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala = 100 μ m.

La proteína MtCOPT1 se localiza en la membrana plasmática de células infectadas y no infectadas de las zonas de diferenciación- fijación del nódulo

La distribución subcelular de MtCOPT1 se verificó por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Para ello, se realizó una construcción del gen *MtCOPT1* (exones + intrones) junto con el promotor usado en los ensayos GUS y se le fusionó a 3 epítomos HA en N-terminal. Las plantas de *M. truncatula* transformadas con este vector fueron transferidas a macetas con perlita estéril como sustrato e inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP. La distribución de MtCOPT1 observada en este caso estaría dispuesta a lo largo de las zonas de infección-diferenciación y el comienzo de la zona de fijación (Figura 17A). Una vista más en detalle, localiza a MtCOPT1-HA en la periferia de las células, posiblemente en la membrana plasmática (Figura 17B). Algunos de los cortes de los nódulos transformados con MtCOPT1-HA, se utilizaron para verificar la ausencia de autofluorescencia (Anexo II-1).

Figura 17: Localización subcelular de MtCOPT1. A) Sección de un nódulo de plantas de *M. truncatula* transformadas con MtCOPT1 fusionado a HA, bajo el control de su propio promotor, e inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP (verde, panel superior derecho). El ADN se tiñó con DAPI (azul, panel superior izquierdo). La localización de MtCOPT1-HA se determinó utilizando un anticuerpo marcado con Alexa594 (rojo, panel inferior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron junto con la imagen del nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala = 100 μ m. B) Vista en detalle de A. El panel de la izquierda muestra la señal del anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa594 (rojo), el central la localización de *S. meliloti* (verde) y ADN (azul). El panel de la derecha muestra la superposición de los otros dos paneles. Barra de escala = 25 μ m. C) Localización de la proteína de membrana plasmática AtPIP2 marcado con CFP (cián, panel izquierdo), de MtCOPT1 fusionado a GFP (verde, panel central), y su superposición (panel derecho) en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes se superpusieron junto con otra imagen en transiluminación. Barra de escala = 25 μ m.

Para confirmar la localización de MtCOPT1 en la membrana plasmática, la secuencia codificante de *MtCOPT1* se fusionó a GFP en posición N-terminal bajo la dirección del promotor constitutivo 35S de Virus del Mosaico de la Coliflor. Esta construcción se expresó transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, en conjunto con un marcador de membrana plasmática (AtPIP2) marcado con proteína fluorescente cian (CFP). Las mismas construcciones se agroinfiltraron por separado para descartar la presencia de señal autofluorescente (Anexo II). La fluorescencia emitida por ambos marcadores se visualizó utilizando microscopía confocal. Ambas señales se superponían en la periferia de las células (Figura 17C), sugiriendo que MtCOPT1 se localiza en la membrana plasmática.

De este modo, MtCOPT1 estaría introduciendo cobre desde el apoplasto al interior celular a lo largo de la zona de infección-diferenciación del nódulo, indistintamente de si las células son infectadas o pertenecen al córtex del nódulo

La mutación de MtCOPT1 afecta a la capacidad de fijar nitrógeno en la simbiosis con S. meliloti

Con el fin de estudiar el papel de MtCOPT1 en la simbiosis con *S. meliloti*, se obtuvo la línea mutante NF19829 (*copt1-1*) de la colección de la Samuel Roberts Noble Foundation (Ardmore, EEUU). Esta línea presenta la inserción de un elemento transponible de *N. tabacum* (Tnt1) (Tadege *et al.*, 2008) en el nucleótido 32 de la secuencia de *MtCOPT1*. Para la obtención de líneas homocigotas, las semillas segregantes recibidas fueron cultivadas y se extrajo ADN de cada planta por separado para su posterior genotipado por PCR, como se detalla en materiales y métodos. Estudios por RT-PCRs en material extraído de nódulos silvestres o de nódulos mutantes *copt1-1* muestran que se logró un total silenciamiento del gen (Figura 18A). Como control de la transcripción para cada muestra, se utilizó el gen de la *ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa 1*.

Como la expresión de *MtCOPT1* es exclusiva de nódulos, se evaluó el efecto de la mutación en plantas inoculadas con *S. meliloti*. Los mutantes *copt1-1* exhibieron una menor tasa de crecimiento que el silvestre (Figura 18B), lo que resultó en una disminución de la biomasa foliar y radicular (Figura 18C). No se encontraron diferencias en la coloración ni en número de nódulos (Figura 18D). La actividad nitrogenasa de las plantas *copt1-1* medida mediante el ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968), disminuyó en un 50% en comparación con el silvestre (Figura 18E). Dado que los mutantes de *M. truncatula* generados por transposición de *Tnt1* pueden presentar hasta 20 inserciones del transposón en su genoma (Tadege *et al.*, 2008), para poder asociar este fenotipo a la mutación y descartar que esté asociado a otra inserción, se transformaron plantas *copt1-1* con el gen completo de

MtCOPT1 bajo la expresión de su propio promotor. La línea transformante *copt1-1::MtCOPT1* es capaz de recuperar el fenotipo original del silvestre, tanto en tamaño y biomasa, como en actividad nitrogenasa (Figura 18E).

Figura 18: Fenotipo resultante de la mutación de *MtCOPT1*. A) Detección de la expresión de *MtCOPT1* en nódulos de *M. truncatula* control y mutante (*copt1-1*). La expresión de Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa1 (*MtUb1*) se usó como control positivo de amplificación. B) Crecimiento de plantas representativas de control, *copt1-1*, y *copt1-1* transformado con una copia silvestre de *MtCOPT1*. Barra de escala = 1 cm. C) Biomasa en raíz y parte aérea. Los datos son el resultado de $\pm$ SD de $n = 25$ plantas. D) Número de nódulos en dichas líneas. Las barras de error son el resultado de $\pm$ SD de $n = 25$ plantas. E) Actividad nitrogenasa medida mediante el ensayo de reducción de acetileno. Los resultados son la media $\pm$ SD de tres réplicas de cuatro plantas transformadas independientemente. Los asteriscos muestran diferencias significativas por debajo de $p < 0.05$.

La actividad nitrogenasa detectada en los nódulos de plantas *copt1-1* podría deberse a la acción de otra proteína *COPT* que colaborara con MtCOPT1. En tal caso, podría ser esperable una inducción en la transcripción de otros miembros de la familia en el mutante *copt1-1*. Para determinarlo, se realizó una qRT-PCR en muestras de nódulo de R108 y *copt1-1*, donde se analizó la expresión de los miembros de la familia *COPT* de *M. truncatula*. Ninguno de los genes analizados presentaba diferencias significativas en su expresión entre silvestre y *copt1-1* (Figura 19).

Figura 19: Expresión de los miembros de la familia *COPT* en nódulos de *M. truncatula* control (negro) y mutante *copt1-1* (blanco). Datos relativizados a la expresión estándar del gen constitutivo ubiquitina carboxiterminal hidrolasa 1. Cada valor es la media de tres experimentos independientes $\pm$ SD.

A pesar de su localización específica de nódulo y para descartar algún tipo de efecto de las otras inserciones de *Tnt1* en el genoma de *copt1-1*, se determinó que fenotipo mostraban estas plantas en condiciones no simbióticas, a las que se suplementa con nitrato amónico en la solución de riego y *MtCOPT1* no se expresa. Las plantas *copt1-1* fertilizadas con una fuente externa de nitrógeno no mostraron ninguna diferencia significativa en tasa de crecimiento ni biomasa, al compararlas con las silvestres (Figura 20).

Figura 20: Fenotipo de *copt1-1* en plantas fertilizadas con nitrógeno. A) Crecimiento de plantas representativas de control y *copt1-1*. Barra de escala = 1 cm. B) Biomasa de control y *copt1-1*. Los datos son la media $\pm$ SD ($n = 20$ plantas).

De este modo, MtCOPT1 estaría transportando cobre desde el apoplasto al interior de las células de la planta en la zona de diferenciación del nódulo, un proceso que, al ser mutado en *copt1-1*, repercute en la capacidad de la planta para fijar nitrógeno. La mutación impediría incorporar cobre al citoplasma de las células, por lo que el cobre quedaría acumulado en el apoplasto de la zona II del nódulo. Consistente con esta afirmación, se detectaron alteraciones en la concentración de cobre en *copt1-1* al medir los niveles de cobre en raíz, parte aérea y nódulos de silvestre, *copt1-1* y *copt1-1* complementado.

Figura 21: Contenido en cobre de parte aérea, raíz y nódulos de plantas control, *copt1-1*, y *copt1-1* transformado con MtCOPT1. Los resultados son la media $\pm$ SD de tres sets de 5 plantas transformadas.

En nódulos, el contenido de cobre fue más abundante en el mutante *copt1-1* (Figura 21), doblando el contenido acumulado en el silvestre. El aumento en la concentración de cobre en *copt1-1* podría ser manifestado también como un cambio en la distribución de cobre a lo largo del nódulo. Para comprobarlo, nódulos del mutante *copt1-1* se incubaron con el fluoróforo Coppersensor-1 (CS1) (Zeng *et al.*, 2006), y se visualizaron al microscopio confocal (Figura 22). Se compararon con los nódulos la planta silvestre teñidos y visualizados en igualdad de condiciones. No se evidenció ninguna diferencia significativa en la distribución de cobre entre las dos muestras, probablemente debido a que, a pesar de doblar su concentración, la sonda de cobre no sea suficientemente sensible como para poder discriminar este cambio de concentraciones (Figura 22).

Figura 22: Efecto de la mutación en *MtCOPT1* sobre la distribución de cobre. A) Sección de nódulo de planta control. Panel de la izquierda, distribución de cobre visualizado con la sonda CS1, panel de la derecha imagen de transiluminación del nódulo. B) Sección de nódulo de planta *copt1-1*. Panel de la izquierda, distribución de cobre visualizado con la sonda CS1, panel de la derecha imagen de transiluminación del nódulo. Barra de escala = 100 µm.

El fenotipo de *copt1-1* se debe a un menor aporte de cobre para la fijación simbiótica de nitrógeno

Para determinar si el factor que limitaba la actividad nitrogenasa en *copt1-1* era el cobre, se cultivaron plantas *copt1-1* a las que se adicionó un contenido 100 veces mayor de cobre a la solución de riego. Se observó que, al incrementar la concentración de cobre adicionada, el tamaño del mutante aumentaba con respecto a plantas crecidas a la concentración estándar de cobre (Figura 23A), algo que también se reflejaba en las medidas de biomasa (Figura 23B). La actividad nitrogenasa en *copt1-1* pasaba del ser del 40 % al 95 %, cuando se comparó con sus respectivos silvestres (Figura 23C). Como el cobre no actúa como cofactor de ninguna enzima directamente relacionada con la nitrogenasa, la caída de actividad de esta enzima presentada por el mutante *copt1-1* podría ser consecuencia de un efecto indirecto. Las COX son proteínas implicadas en la cadena respiratoria que requieren cobre como cofactor. La COX cbb3, con alta afinidad por oxígeno, es capaz de usar O₂ como aceptor de electrones en condiciones de microaerobiosis (Preisig *et al.*, 1996). Para determinar si el fenotipo de *copt1-1* en simbiosis era debido a una deficiente actividad COX, se analizó la actividad COX de los bacteroides usando como aceptor de electrones terminal N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD). Para ello, se aislaron bacteroides de nódulos de plantas a los 28 días post inoculación. Estos bacteroides purificados se emplearon para determinar la actividad COX mediante reducción de TMPD. El TMPD reducido se estandarizó frente al contenido en proteína de las muestras. La muestra de *copt1-1* presentaba una disminución del 60 % de la actividad COX en comparación al silvestre (Figura 23D).

Figura 23: Complementación por cobre del fenotipo de *copt1-1*. A) Crecimiento de plantas control y *copt1-1* representativas. Las plantas se regaron con una solución con 0,16 mM Cu (solución estándar, control) y con 16 mM (exceso). Barra de escala = 3 cm. B) Biomasa producida por plantas control y *copt1-1*, medida como peso seco. Los datos son la media $\pm$ SD de $n = 11$ plantas. C) Actividad nitrogenasa medida como reducción de acetileno. Los datos son la media $\pm$ SD de tres sets de 4 plantas cada uno. D) Actividad citocromo oxidasa medida en bacteroides de silvestre y *copt1-1*. Los valores son la media $\pm$ SD de tres sets de 4 plantas cada uno. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sin embargo, cuando se adicionó cobre de manera exógena en la solución de riego, esta actividad se recuperó, al igual que ocurre con la actividad nitrogenasa. Esta disminución de la actividad COX no se debía a una menor tasa de expresión de los genes que codifican a esta enzima, dado que la expresión de los dos genes de la subunidad I de los dos citocromos cbb3 de *S. meliloti* (SmaFixN1 y SmaFixN2) no cambiaba significativamente en plantas *copt1-1* comparados con la planta silvestre (Figura 24).

Figura 24: Expresión de los genes de citocromo oxidasas de *S. meliloti*. FixN1 (Sma1220) y FixN2 (Sma0765) forman parte de dos citocromos oxidasas tipo cbb3 independientes de expresión en nódulos formados tras inocular *M. truncatula* con *S. meliloti*. Su expresión en silvestre y *copt1-1* se midió y se relativizó respecto al gen de la piruvato deshidrogenasa B (Smc1031). Los valores son la media $\pm$ SD de tres ensayos independientes.

Todos estos datos sugieren que el cobre es necesario para el correcto funcionamiento de las citocromos oxidasas de nódulo. Cuando disminuye la cantidad de cobre disponible como cofactor en el interior del bacteroide, las citocromos oxidasas intentan suplir esta carencia con una mayor expresión. Sin embargo, la menor actividad citocromo oxidasa generada por la deficiencia de cobre en el bacteroide determina una menor tasa de respiración oxidativa, que causa una disminución de la actividad nitrogenasa en el mutante *copt1-1*, y menor biomasa de la planta.

MtCOPT2

MtCOPT2

El parecido de *MtCOPT1* y *MtCOPT2*, y el hecho de que no se hayan detectado transcritos de este último en ninguna de las condiciones evaluadas en el apartado anterior, sugiere que MtCOPT2 podría jugar un papel en otras relaciones simbióticas de *M. truncatula*, siendo la micorriza arbuscular la opción más probable. Como se indicaba en la introducción, los hongos formadores de micorrizas arbusculares son capaces de transferir metales a la planta hospedadora cuando existen bajos niveles de éstos en el suelo (Smith & Smith, 2011). En este sentido, sería factible suponer la existencia de un transportador COPT de la planta hospedadora responsable de introducir cobre desde el espacio periarbuscular. Dada la relación evolutiva entre micorrizas y nódulos (Genre & Russo, 2016), cabría esperar que este transportador tuviera un elevado grado de parecido con MtCOPT1.

MtCOPT2 se expresa en raíces micorrizadas

Se analizó la expresión de la familia de transportadores *COPT* de *M. truncatula* en raíces de plantas inoculadas con *R. irregularis*, y se comparó el patrón de expresión con el detectado en raíces de *M. truncatula* crecidas en igualdad de condiciones, pero sin inocular. De los 8 transportadores *COPT* de *M. truncatula*, *MtCOPT3* y *MtCOPT5* se detectaron a un nivel prácticamente idéntico en ambas condiciones, expresándose en todas las condiciones analizadas, tanto en simbiosis con *S. melliloti* (Figura 13), como en la simbiosis con *R. irregularis*, como en sus respectivos controles. A diferencia de éstos, *MtCOPT6* se expresa a más altos niveles en raíces micorrizadas que en no micorrizadas (Figura 25). Sin embargo, el transportador cuya expresión relativa es mayor al comparar raíces sin inocular frente a raíces micorrizadas con *R. irregularis* es *MtCOPT2* (Figura 25).

Figura 25: Expresión de la familia *COPT* de *M. truncatula* en raíces micorrizadas respecto al estándar interno Ubiquitina Carboxi-terminal Hidrolasa, en muestras de raíz no micorrizada (RNM) frente a muestras de raíz micorrizada (RM). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ SD. No se detectó expresión para los genes *MtCOPT1*, *MtCOPT4* y *MtCOPT7*.

MtCOPT2 se localiza en células con arbuscúlos

La expresión de *MtCOPT2* lo sitúa en raíces micorrizadas. Para concretar la localización de la expresión de *MtCOPT2* a lo largo de los tejidos de la raíz, se transformaron plantas de *M. truncatula* con el promotor de *MtCOPT2* fusionado a GFP. Como promotor se consideró inicialmente la región de 2 kb localizada aguas arriba del codón de inicio. La secuencia promotora de *MtCOPT2* en *M. truncatula* ecotipo

A17 publicada en la página web de *M. truncatula* genome project (<http://www.jcvi.org/medicago/>) aparecía incompleta, con una delección de unas 1000 pb de las 2000 pb a usar. Mediante inferencia desde la secuencia promotora de *MtCOPT2* del ecotipo R108 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el promotor y clonarlo. Tras la amplificación del promotor usando como molde ADN genómico de los ecotipos R108 y A17 en reacciones independientes, se observó una diferencia substancial en el tamaño de los fragmentos amplificados (1757 nucleótidos en el caso de R108 y 2810 para A17), por lo que ambos se secuenciaron (Anexo III). Las primeras 1500 pb del fragmento de promotor más cercano al codón de inicio son idénticas al 94,1 %, mientras que la región más alejada hasta el nucleótido -2810 posee una identidad inferior al 30 %.

La secuencia promotora de 2,8 kb de A17 fue la empleada para los estudios de localización, fusionada a GFP. Las plantas de *M. truncatula* ecotipo A17 transformadas con esta construcción se transfirieron a macetas de arena:vermiculita estéril suplementadas con 0,5 g/l de osmocote, y cada planta fue inoculadas con *R. irregularis*. Tras 28 días post inoculación, se comprobó por microscopía óptica de fluorescencia la localización de la señal GFP. El marcaje del promotor con GFP se observó en algunas células del córtex la raíz, que corresponderían con las células infectadas con hongos formadores de micorrizas arbusculares en las cuales se ha producido el desarrollo de arbusculos (Figura 26A). Se identificó la presencia de arbusculos en las células en las que se detectaba fluorescencia, alternando sobre una misma muestra microscopía óptica de contraste de fases con microscopía óptica de fluorescencia.

Para corroborar la localización de la proteína, se transformaron plantas de *M. truncatula* con la secuencia completa de *MtCOPT2* regulada por la misma secuencia promotora, y fusionada a GFP. Las plantas transformadas con esta construcción se transfirieron a macetas de arena:vermiculita estéril suplementadas con 0,5 g/l de osmocote, y cada planta se inoculó con *R. irregularis*. Tras 28 días post inoculación, se comprobó por microscopía óptica de fluorescencia la localización de la señal GFP. La localización de la señal GFP se sitúa en células aisladas, que colocaliza con células donde se observan arbusculos por microscopía de contraste de fases (Figura 26B-C).

Figura 26: Localización de MtCOPT2. A) Localización de la expresión de MtCOPT2 mediante visualización de GFP regulado por el promotor de MtCOPT2. Barra de escala, 10 μm . B) Localización de MtCOPT2. Plantas de *M. truncatula* transformadas con el gen completo de MtCOPT2 bajo el control de su propio promotor y fusionado a GFP. En el panel de la izquierda se observa la sección con transiluminación, en la central la imagen emitida por GFP, y en la derecha la superposición de ambas imágenes. Barra de escala = 25 μm . C) Magnificación del rectángulo señalado en B. Barras de escala = 10 μm . D) Expresión heteróloga en *N. benthamiana*. En el panel de la izquierda se ve el marcador de membrana plasmática en cian, en el central la secuencia codificante de MtCOPT2 fusionada a GFP, y en el de la derecha la superposición de ambas imágenes. Barra de escala = 30 μm .

La localización subcelular de MtCOPT2 se determinó en el sistema heterólogo *N. benthamiana*. Plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con la construcción que contenía la secuencia codificante de *MtCOPT2* fusionada a GFP. La fluorescencia emitida sitúa a MtCOPT2 en la periferia de las células, colocalizando junto con el marcador de membrana plasmática AtPIP2 marcado con proteína fluorescente cian (CFP) (Figura 26D). MtCOPT2 se comportaría como una proteína de membrana plasmática en este sistema heterólogo. Sin embargo, la localización intracelular de MtCOPT2 en *M. truncatula* no la sitúa en la periferia de la célula, sino que parece estar presente en forma granulosa en el interior de la célula. Esta localización sugiere que MtCOPT2 podría estar actuando en la membrana periarbuscular. La localización en la membrana periarbuscular de *M. truncatula* se ha descrito previamente para otras proteínas implicadas en el transporte de nutrientes desde el espacio periarbuscular a la planta como son MtPT4 (Harrison *et al.*, 2002) o MtAMT2.3 (Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015). Esto significaría que MtCOPT2 debería importar su sustrato desde el espacio periarbuscular hacia el citoplasma de la célula hospedadora.

MtCOPT2 transporta cobre hacia el citosol

Al igual que MtCOPT1 y otros transportadores de la familia COPT/Ctr (Perea-García *et al.*, 2016), MtCOPT2 presenta tres dominios transmembrana (TMD), un motivo conservado Mx₃Mx₁₂Gx₃G entre los dominios TMD2 y TMD3, una región N-terminal localizada extracelularmente y una región C-terminal citoplásmica (Figura 28), (Aller *et al.*, 2004).

Para confirmar que el sustrato transportado por MtCOPT2 es cobre, la secuencia codificante de *MtCOPT2* fue clonada en el vector pDR196, bajo el control del promotor de la *H⁺-ATPasa tipo P2* (PMA1) de *S. cerevisiae*. Esta construcción se introdujo en el mutante $\Delta ctr1$ de *S. cerevisiae* (Dancis *et al.*, 1994). Como se indicó en el capítulo anterior, este mutante carece de su principal sistema de captación de cobre desde el medio, y es incapaz de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables, como es el medio YPEG.

Figura 27: Determinación del sustrato transportado por MtCOPT2. A) Topología de MtCOPT2. Resaltado en rojo está el motivo MxxxM y en verde el motivo GxxxG, altamente conservados en proteínas COPT. B) Se transformó a cepa parental BY4741 con el vector vacío pDR196, mientras que la cepa $\Delta ctr1$ se transformó tanto con el vector vacío como con pDR196 conteniendo la secuencia codificante de MtCOPT2. Diluciones seriadas de los transformantes (10X) se crecieron a 28 °C durante 2 días.

Al igual que MtCOPT1, se esperaba que MtCOPT2 una vez introducido en $\Delta ctr1$ estimulara el transporte de cobre y permitiera realizar la respiración oxidativa. Para ello, diluciones seriadas de la cepa $\Delta ctr1$ transformada con MtCOPT2, se plaquearon en YPEG suplementado con concentraciones comprendidas entre 5 μ M y 1mM CuSO₄. Se usó YPD como medio de cultivo control para el crecimiento de todas las cepas (Figura 27). Como control negativo se usó la misma cepa $\Delta ctr1$ con el plásmido vacío pDR196, y como control positivo la cepa parental BY4741 también transformada con el plásmido vacío. La expresión de MtCOPT2 en el fondo $\Delta ctr1$ restableció la capacidad respiratoria del mutante al mismo nivel que el silvestre al ser plaqueados en el medio YPEG con 10 μ M CuSO₄.

MtZI P6

MtZIP6

Durante el proceso de fijación de nitrógeno, intervienen un alto número de metaloproteínas (Brear & Smith, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2014). Entre los cofactores metálicos que se requieren para completar su funcionalidad, se encuentra el zinc. Aparte de formar parte de dedos de zinc y factores de transcripción, el zinc forma parte de metaloproteínas del nódulo como Cu/ZnSOD, que se encarga de la detoxificación de radicales libres (Rubio *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2004). Para que el zinc llegue a formar parte de estas moléculas, debe ser transportado al interior del bacteroide (Clarke *et al.*, 2014). Facilitando este intercambio, se encontrarían transportadores de diferentes familias (González-Guerreo *et al.*, 2014). Los miembros de la familia ZIP (Zrt1-like, Irt1-like Proteins) transportan cationes divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} o Ni^{2+} (Eide *et al.*, 1996; Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000), e intervienen en captación y redistribución de los mismos a lo largo de la planta. A lo largo de este capítulo se evaluará la función de un miembro de la familia ZIP en nódulos de *M. truncatula*.

MtZIP6 se expresa en nódulos

A partir de datos de análisis transcriptómicos de nódulo preexistentes en el grupo, se seleccionó el transportador previamente nombrado como MtZIP6 (López-Millán *et al.*, 2004) por presentar la mayor expresión en el nódulo. La validación de los datos transcriptómicos se realizó por medio de PCR cuantitativa a tiempo real, en la que se analizó la expresión de *MtZIP6* en raíz y parte aérea de plantas fertilizadas con nitrato amónico, y en raíz, nódulo y parte aérea de plantas inoculadas con *S. meliloti* (Figura 28A). *MtZIP6* se expresaba en raíces tanto inoculadas como fertilizadas con nitrógeno, pero su máximo de expresión se encontró en nódulos. No se detectó expresión en las partes aéreas de la planta.

Cuando la planta se expuso a condiciones de deficiencia de zinc, los transportadores tipo ZIP encargados de suplementar este metal, suelen responder incrementando su expresión (Milner *et al.*, 2013). Para analizar los cambios de expresión de *MtZIP6*, plantas de *M. truncatula* se inocularon con *S. meliloti* y fueron regadas con soluciones con concentraciones crecientes de zinc (0 μ M, 0,13 μ M, 0,26 μ M, 0,38 μ M, 3,8 μ M y 38 μ M de ZnSO_4). Tras 28 días post inoculación, las plantas se procesaron y se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real el efecto de la variación en la concentración de zinc sobre la expresión de *MtZIP6*. La expresión de *MtZIP6* en nódulo no estaba regulada por la concentración externa de zinc, sin embargo, en raíz se produjo un patrón escalonado de expresión cuyo máximo, tanto en raíces fertilizadas como inoculadas, ocurre en condiciones de deficiencia (0 μ M) o de ligera toxicidad (38 μ M) (Figura 28B).

Para obtener mayor información sobre la posible funcionalidad de MtZIP6, se comparó la secuencia de las 16 proteínas ZIP codificadas en el genoma de *M. truncatula* frente a otras proteínas de la familia ZIP de plantas. Para ello, se mantuvo la misma nomenclatura para los genes ya descritos: MtZIP1, *Medtr2g064310*; MtZIP2, *Medtr2g097580*; MtZIP3, *Medtr3g081580*; MtZIP4, *Medtr3g082050*; MtZIP5, *Medtr1g016120*; MtZIP6, *Medtr4g083570* y MtZIP7, *Medtr3g058630*; los miembros de la familia ZIP de *M. truncatula* anotados con posterioridad, se nombraron como sigue: MtZIP8, *Medtr2g098150*; MtZIP9, *Medtr3g081640*; MtZIP10, *Medtr3g081690*; MtZIP11, *Medtr3g104400*; MtZIP12, *Medtr4g065640*; MtZIP13, *Medtr5g071990*; MtZIP14, *Medtr6g007687*; MtZIP15, *Medtr7g074060* y MtZIP16, *Medtr8g105030*. El grado de similitud, y por tanto la cercanía en el árbol, no parece reflejar el sustrato transportado (Figura 28C). En el mismo clado que MtZIP6 abundan las proteínas capaces de transportar hierro y zinc, entre otros sustratos (Vert *et al.*, 2001; Bughio *et al.*, 2002; Lopez-Millan *et al.*, 2004; Shanmugam *et al.*, 2011; Milner *et al.*, 2013).

Figura 28: Expresión de MtZIP6 y relación con otros miembros de la familia ZIP. A) Expresión de MtZIP6 en raíz, parte aérea y nódulos en relación al estándar interno Ubiquitina Carboxiterminal Hidrolasa. Los valores con el resultado de la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. N.D. indica que los transcritos no se detectaron. B) Efecto de la concentración de zinc sobre MtZIP6. Expresión de MtZIP6 en raíz y nódulos de plantas suplementadas con distintas concentraciones de zinc respecto al estándar interno de Ubiquitina Carboxi-terminal Hidrolasa. Los valores son la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. C) Árbol de transportadores de la familia ZIP de *M. truncatula* y homólogos en otras plantas. Los círculos coloreados indican el sustrato propuesto en cada caso.

MtZIP6 comparte muy poca similitud de secuencia con GmZIP, un miembro de la familia ZIP de *G. max* descrito previamente como un transportador de zinc específico de nódulo (Moreau *et al.*, 2002). La preferencia de sustrato también cambia entre ambos, transportando GmZIP únicamente Zn^{2+} , mientras que MtZIP6 transporta tanto Zn^{2+} como Fe^{2+} hacia el citosol (Lopez-Millan *et al.*, 2004). Dentro de los transportadores ZIP de *M. truncatula*, MtZIP16 es el más parecido con un 72% de identidad (Figura 28C).

MtZIP6 se localiza en la membrana plasmática de células de la zona de infección-diferenciación del nódulo

El transporte de metales hacia el nódulo engloba los procesos de salida de metales desde el cilindro vascular del nódulo hacia el apoplasto de la zona II, y su posterior incorporación a las células infectadas (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013). Si MtZIP6 está implicado en el transporte de metal al nódulo, debería expresarse en la zona de diferenciación y las capas celulares más adyacentes a ésta. Para comprobar la localización de la expresión a nivel tisular de *MtZIP6*, se llevó a cabo un ensayo de actividad GUS. Para ello, se transformaron plantas de *M. truncatula* con las 2 kb localizadas aguas arriba del codón de inicio, fusionadas al gen de la β -glucuronidasa. Plantas transformadas con esta construcción fueron transferidas a macetas de perlita estéril e inoculadas con *S. meliloti*. A los 28 días post inoculación, muestras de nódulo y raíz se recogieron e incubaron con X-gluc. Mediante este ensayo se localizó la expresión de *MtZIP6* en la región apical del nódulo y en la vasculatura de la raíz (Figura 29). Secciones de 100 μm de nódulos permitieron delimitar la expresión de *MtZIP6* a la zona de diferenciación y el comienzo de la zona de fijación (Figura 29B). El patrón de expresión de *gus* reproduce los datos disponibles en la base de datos Symbimics (Figura 29C; Roux *et al.*, 2014), donde *MtZIP6* comenzaba a expresarse al comienzo de la zona de infección, y su expresión aumentaba hasta alcanzar el máximo en la interzona. La actividad GUS en cortes de raíz se visualizaba en torno al xilema (Figura 29D).

Figura 29: Expresión tisular de MtZIP6. A) Actividad GUS en nódulos y raíces de *M. truncatula* transformados con el promotor de MtZIP6 fusionado a gus. Barra de escala = 1mm. B) Sección longitudinal de nódulo transformado con la misma construcción, siendo ZI: Zona I; ZIId, Zona II distal; ZIIp, zona II proximal; IZ- interzona; ZIII, Zona III. Barra de escala = 200 μm C) Expresión de MtZIP6 a lo largo de las distintas zonas de diferenciación del nódulo, siendo ZI: Zona I; ZIId, Zona II distal; ZIIp, zona II proximal; IZ- interzona; ZIII, Zona III. Datos obtenidos de la base de datos symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics>). D) Sección de una raíz de *M. truncatula* transformada con la misma construcción. Barra de escala = 100 μm .

Para validar estos resultados y determinar la localización subcelular, se obtuvieron plantas transformadas con *A. rhizogenes* portando un vector con *MtZIP6* fusionado a tres epítomos HA en su región C-terminal. Previamente, se determinó que la adición del epítomo HA no afectaba a la funcionalidad de la proteína, puesto que tanto MtZIP6 marcado como no marcado con HA son capaces de restaurar el fenotipo mutante de *S. cerevisiae zrt1/zrt2*, incapaz de incorporar zinc al interior celular (Figura 30).

Figura 30: El epítipo HA no afecta a la funcionalidad de MtZIP6. A) Complementación de levaduras con MtZIP-HA. La cepa DY1457 se transformó con pDR196 vacío, mientras que $\Delta zrt1 \Delta zrt2$ se transformó tanto con pDR196 vacío, como conteniendo MtZIP6 o MtZIP6-HA. Diluciones seriadas (10x) de cada transformante se plaquearon en SD suplementado con 1 mM ZnSO₄, o sin suplementar.

La construcción usada en inmunolocalización constaba del gen MtZIP6 al completo (Intrones + exones), bajo el control del mismo fragmento de promotor usado en los estudios de expresión GUS. MtZIP6-HA se detectó mediante un anticuerpo conjugado al fluoróforo Alexa594 (rojo). El ADN se tiñó con DAPI (azul). Las plantas transformadas fueron inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP (verde). Los resultados obtenidos en los estudios de inmunolocalización apoyaban los resultados de la actividad GUS, localizando MtZIP6-HA en la zona de diferenciación del nódulo (Figura 31A-B). A nivel celular, MtZIP6 se detectó en la periferia de las células infectadas, posiblemente la membrana plasmática (Figura 31B). No se detectó señal en células no infectadas. En raíz, tal y como se aprecia en los estudios de expresión GUS, MtZIP6-HA se localizaba en la estela, próximo al xilema (Figura 31C).

Figura 31: Localización subcelular de MtZIP6-HA. A) Sección de un nódulo de plantas de *M. truncatula* transformadas con MtZIP6 fusionado a HA, bajo el control de su propio promotor, e inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP (verde, panel superior derecho). El ADN se tiñó con DAPI (azul, panel superior izquierdo). La localización de MtZIP6-HA se determinó utilizando un anticuerpo marcado con Alexa594 (rojo, panel inferior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron junto con la imagen del nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala = 100 μ m. B) Reconstrucción tridimensional de células de nódulo marcadas con el mismo proceso histoquímico que en A. Barra de escala = 25 μ m. C) Sección trasversal de raíz transformada con MtZIP6-HA. El panel izquierdo muestra el corte bajo transiluminación. El panel central muestra la señal de MtZIP6-HA marcado con un anticuerpo conjugado con Alexa594 (rojo); la endodermis puede observarse en verde fruto de autofluorescencia. El panel de la derecha muestra la superposición de los paneles anteriores. Barra de escala = 50 μ m.

Para confirmar la posible localización de membrana, la secuencia codificante de *MtZIP6* se fusionó a GFP bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Figura 32A), y se agroinfiltró en hojas de *N. benthamiana* junto con un marcador de membrana plasmática marcado con CFP (Figura 32B). Las células infiltradas expresando ambas construcciones mostraban una superposición de la señal GFP y CFP, coincidente con la membrana plasmática (Figura 32C). La distribución de MtZIP6 en nódulo, en la membrana de células infectadas, sugiere un posible papel de MtZIP6 en el transporte de metal hacia el citoplasma de las células infectadas.

Figura 32: Expresión heteróloga de MtZIP6 en *N. benthamiana*. En el panel de la izquierda se ve la secuencia codificante de MtZIP6 fusionada a GFP, en el central el marcador de membrana plasmática AtPIP2 marcado en cian, y en el de la derecha la superposición de ambas imágenes. Barra de escala = 50 μ m

El silenciamiento de MtZIP6 tiene un efecto negativo en la fijación de nitrógeno

El mutante disponible en la Samuel Roberts Noble Foundation en el gen *MtZIP6*, segregaba de tal manera que presentaba un fenotipo letal asociado a homocigosis. En su lugar, para poder estudiar como contribuye MtZIP6 a la nutrición de metales del nódulo y la fijación de nitrógeno, se crearon líneas de ARNi. Debido a que el grado de silenciamiento génico puede variar de una planta a otra, se seleccionaron varias plantas para los análisis descritos a continuación, con el fin de minimizar los efectos derivados de cada inserción independiente. Para la construcción de las líneas de ARNi, se utilizaron las primeras 469 pb de la secuencia codificante de *MtZIP6*. Dos copias de este fragmento se introdujeron de forma antiparalela flanqueando a un intrón en el vector pFRN, formándose un ARNm de cadena doble cuando se elimina el intrón por splicing. Como control se usaron plantas transformadas de igual modo, en el que pFRN tenía insertado las 450 primeras pares de bases del gen *gus* (que no tiene homólogo en *M. truncatula*). Mediante esta técnica se consiguió una reducción del 80 % de la transcripción original de *MtZIP6* (Figura 33A). En condiciones no simbióticas, las plantas se regaron con solución nutritiva

suplementada con NH_4NO_3 . En dichas condiciones, no se observaron alteraciones de crecimiento entre plantas *mtzip6* generadas por ARNi y sus respectivos controles (Figura 33B). No se encontraron diferencias significativas entre la biomasa de raíz y parte aérea del control y las plantas silenciadas en *MtZIP6* (Figura 33C).

Figura 33: Fenotipo de plantas silenciadas en *MtZIP6* crecidas bajo aporte externo de nitrato amónico. A) Expresión de *MtZIP6* en nódulos de plantas controles y silenciadas relativizados frente a la expresión del gen de ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa. Los valores son la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. B) Crecimiento de plantas representativas controles y silenciadas. Barra de escala = 3 cm. C) Peso seco de parte aérea y raíz de plantas controles y silenciadas. Cada valor es la media $\pm$ SD ($n = 10$ plantas).

Sin embargo, en condiciones simbióticas fruto de la inoculación de las plantas transformantes de *M. truncatula* con *S. meliloti*, las plantas ARNi *mtzip6* estaban severamente afectadas en su crecimiento (Figura 34A). La biomasa de estas plantas se vió reducida en un 70 % en su parte aérea y en un 68 % en las raíces (Figura 34B). El desarrollo de los nódulos también está afectado, con nódulos blancos no funcionales de menor tamaño (Figura 34C-D).

Figura 34: Fenotipo en condiciones simbióticas de plantas silenciadas en MtZIP6. A) Crecimiento de plantas controles y silenciadas representativas. Barra de escala = 3 cm. B) Peso seco de parte aérea y raíz. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 11-12$ plantas. C) Número de nódulos por planta. 100% = 3,48 nódulos por planta. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 20$ plantas. D) Vista en detalle de nódulos representativos en plantas controles y silenciadas en MtZIP6. Barra de escala = 500 μ m. E) Actividad nitrogenasa en nódulos de plantas controles y silenciadas a los 28 dpi. Los valores son la media $\pm$ SD de tres sets de 5 plantas transformadas independientemente. Los asteriscos muestran valores significativos ($p < 0,05$).

Este fenotipo se manifiesta mediante la reducción de la capacidad de las plantas silenciadas en *MtZIP6* de fijar nitrógeno, medido mediante el ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). De media, las plantas silenciadas

mostraban una reducción del 90 % en su actividad nitrogenasa por nódulo en comparación con el control (Figura 34E). El resultado de la disminución de actividad nitrogenasa recogido, no fué fruto de una reducción de la síntesis de la nitrogenasa, dado que la subunidad nifH se detectó a niveles similares a la planta control (Figura 35).

Figura 35: Inmunodetección de la proteína nifH en extracto proteico crudo de nódulos controles o silenciados en MtZIP6.

Este fenotipo tampoco se debe a que otros genes de la familia fueran también silenciados junto con *MtZIP6*. Para ello se determinó la expresión en plantas silvestres y silenciadas de los tres miembros de la familia ZIP de *M. truncatula* con mayor porcentaje de similitud a *MtZIP6*: *MtZIP5*, *MtZIP11* y *MtZIP16* (Figura 36). En ningún caso se encontró alguna reducción de la expresión de estos genes, lo que sugiere que *MtZIP6* se silenció con un elevado grado de especificidad.

Figura 36: Expresión de miembros de la familia ZIP en plantas silenciadas en el gen *MtZIP6*. Los homólogos más cercanos a *MtZIP6* son *MtZIP5*, *MtZIP11* y *MtZIP16*. Se comprobó su expresión en raíz y nódulos de silvestre y mutante por RNAi *mtzip6*, relativizándola al estándar interno de ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa. Cada valor es la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. N.D. se muestra en caso de no detectar transcritos.

MtZIP aporta zinc a las células infectadas

MtZIP6 es capaz de transportar hierro y zinc en levaduras (López-Millán *et al.*, 2004). Por tanto, la reducción de actividad nitrogenasa observada podría asociarse a una disminución en el contenido de hierro potencialmente transportado por MtZIP6, que afectaría a la cantidad de hierro disponible para uso como cofactor de la nitrogenasa. Por otra parte, esta disminución podría achacarse a un efecto indirecto causado por la disminución de zinc que repercutiera en la nitrogenasa.

Figura 37: Contenido de hierro y zinc en plantas controles y silenciadas en MtZIP6. A) Contenido de hierro (ppm) a los 28 dpi. Los valores son la media $\pm$ SD de dos sets de 5 plantas transformadas independientemente. B) Contenido de zinc (ppm) en plantas controles y *mtzip6*. Los valores son la media $\pm$ SD de dos sets de 5 plantas transformadas independientemente.

Para diferenciar cuál de los dos metales son transportados por MtZIP6 *in planta* y causar el fenotipo de silenciamiento de *MtZIP6*, se determinó la concentración de hierro y zinc en plantas controles y silenciadas (Figura 37). No se detectó ningún cambio en la concentración de hierro entre las plantas, pero se encontró el doble de zinc en los nódulos de plantas silenciadas que en sus controles. Asimismo, cuando se suplementó con una mayor concentración de hierro la solución de riego, a una concentración capaz de complementar al mutante en el transportador de hierro *nramp1-1* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2015), no se revirtió el fenotipo de la planta silenciada, ni se apreció ningún cambio en la distribución de hierro en la planta usando el método de Perl-DAB (Figura 38) (Roschztardt *et al.*, 2009).

Figura 38: Efecto del silenciamiento de MtZIP6 en la homeostasis de hierro. A) Distribución de hierro en una sección de nódulo de *M. truncatula* control a los 28 dpi. Barra de escala = 200 μm. B) Distribución de hierro en una sección de nódulo de *M. truncatula* silenciada en MtZIP6 a los 28 dpi. Barra de escala = 200 μm. C) Crecimiento de plantas silvestre y silenciadas, regadas en condiciones control y suplementadas con hierro. Barra de escala = 3 cm.

Por el contrario, la distribución de zinc en los nódulos de plantas silenciadas difería notablemente de su control (Figura 39A-B), según se usó el marcador Zinpyr-1 (Sinclair *et al.*, 2007). Cuando se integraron las señales recogidas de Zinpyr-1 en la región anterior y posterior a la interzona de varios nódulos independientes y estos valores se estandarizaron por unidades de superficie, se pudo observar que en la región apical del nódulo (zonas I y II) se acumulaba un contenido de zinc mucho más elevado en las plantas silenciadas en *MtZIP6* que en los controles (Figura 39C). A diferencia de los nódulos control, en las plantas silenciadas se detectaron depósitos de zinc en el apoplasto (Figura 39D-E), consistentes con una reducción en la capacidad de translocar zinc al interior de las células infectadas en la zona II.

Figura 39: Distribución de zinc en nódulos. (A) Distribución en nódulos de plantas control visualizado con Zinpyr (panel izquierda), imagen obtenida por transiluminación (panel central) y superposición de ambos paneles (panel derecho). AZ indica Zona Apical, mientras FZ indica Zona de Fijación. Barra de escala = 200 μm . B) Distribución en nódulos de plantas silenciadas en MtZIP6 visualizado con Zinpyr (panel izquierda), imagen obtenida por transiluminación (panel central) y superposición de ambos paneles (panel derecho). AZ indica Zona Apical, mientras FZ indica Zona de Fijación. Barra de escala = 200 μm . C) Cuantificación de la señal Zinpyr recogida en las zonas apical y de fijación, de nódulos control y mtzip6 RNAi. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 5-12$ nódulos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). D) Vista en detalle de la zona apical de nódulos control en los que el zinc se visualiza con Zinpyr. Barra de escala = 50 μm . E) Vista en detalle de la zona apical de nódulos de plantas silenciadas en MtZIP6 en los que el zinc se visualiza con Zinpyr. Las flechas indican los depósitos apoplásticos de zinc. Barra de escala = 50 μm .

Dado el fenotipo asociado a la homeostasis de zinc, se intentó complementar éste mediante el incremento de la concentración de zinc en la solución nutritiva (Figura 40). Concentraciones superiores a 10 veces la concentración de la solución Jensen eran perjudiciales para las plantas, y esta concentración no fue suficiente como para restaurar el fenotipo silvestre en plantas silenciadas. Una posible causa, es que la suplementación con zinc en la solución nutritiva agravase aún más el alto contenido de zinc del nódulo, y por tanto tuviese un efecto negativo sobre el mismo.

Figura 40: Fenotipo ante exceso de zinc de plantas silenciadas en MtZIP6. A) Crecimiento de plantas controles y silenciadas representativas, regadas con 3,8 y 38 µM de Zn, en condiciones simbióticas. Barra de escala = 3 cm. B) Peso seco de parte aérea y raíz de plantas controles y silenciadas en MtZIP6, regadas con 3,8 y 38 µM de Zn, en condiciones simbióticas. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 10-14$ plantas transformadas independientemente. C) Actividad nitrogenasa en nódulos de plantas controles y silenciadas en MtZIP6 a los 28 dpi, regadas con 3,8 y 38 µM de Zn. Los valores son la media $\pm$ SD de tres sets de 5 plantas transformadas independientemente.

Por ello, se evaluó el fenotipo de las plantas silenciadas en *MtZIP6* en condiciones de deficiencia de zinc, en la que la única fuente de zinc eran las trazas presentes en el sustrato (Figura 41).

Figura 41: Fenotipo ante deficiencia de zinc de plantas silenciadas en MtZIP6. A) Crecimiento de plantas control y silenciadas en MtZIP6 representativas, regadas con 0 o 0,38 μ M de Zn, en condiciones no simbióticas. Barra de escala = 3 cm. B) Crecimiento de plantas control y silenciadas en MtZIP6 representativas, regadas con 0 o 0,38 μ M de Zn, en condiciones simbióticas. Barra de escala = 3 cm. C) Peso seco de parte aérea y raíz de plantas control y silenciadas en MtZIP6 fertilizadas con nitrato amónico. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 12-14$ plantas transformadas independientemente. D) Peso seco de parte aérea y raíz de plantas control y silenciadas en MtZIP6 inoculadas con *S. meliloti*. Los valores son la media $\pm$ SD de $n = 12-14$ plantas transformadas independientemente. E) Actividad nitrogenasa en nódulos de plantas controles y silenciadas a los 28 dpi, regadas con 0 o 0,38 μ M de Zn. Los valores son la media $\pm$ SD de tres sets de 5 plantas transformadas independientemente. Los asteriscos muestran valores significativos ($p < 0,05$).

En estas condiciones no se observó ninguna mejora en el fenotipo de las plantas silenciadas con respecto a las silvestres y no se vio ningún cambio significativo en el crecimiento entre los dos tratamientos, independientemente de si las plantas estaban noduladas o no (Figura 41A-D). Tampoco se detectó ningún cambio en la actividad nitrogenasa cuando las plantas crecieron en concentraciones estándar de zinc o de bajo zinc (Figura 41E).

MtMTP2

MtMTP2

Una vez el zinc ha entrado en el citoplasma de las células infectadas, deberá superar una nueva barrera antes de llegar al lumen de los orgánulos o al interior del bacteroide. Para ello, se necesitan transportadores cuyo sentido de transporte sea desde el citosol al exterior de la célula o al lumen, como actúan los miembros de la familia CDF (Cation Difussion Facilitator) (Gustin *et al.*, 2011). Estos transportadores intervienen exportando metales desde el citoplasma y están implicados en la metalación de apo-metaloproteínas y en tolerancia a metales en organismos de todos los reinos (Haney *et al.*, 2005; Kambe *et al.*, 2006; Montanini *et al.*, 2007). En plantas se conocen como MTP (Metal Transporter Protein) (Montanini *et al.*, 2007), y exportan metales divalentes como Zn^{2+} , Fe^{2+} o Mn^{2+} desde el citoplasma a distintos orgánulos (Kolaj-Robin *et al.*, 2015). La familia MTP/CDF comprende proteínas que podrían estar llevando zinc al simbiosoma.

MtMTP2 se expresa en nódulos de *M. truncatula*

Partiendo de la hipótesis en que los transportadores de la familia CDF podrían estar favoreciendo la redistribución de zinc en el nódulo, se examinó el genoma de *Medicago truncatula* (<http://www.jcvi.org/medicago/>) en busca de genes con similitud a esta familia de transportadores. Al analizar el genoma de *M. truncatula*, se encontraron 13 genes con alta homología a los transportadores de la familia MTP previamente descritos en plantas: MtMTP1, Medtr8g024240; MtMTP2, Medtr4g064893; MtMTP3, Medtr2g036390; MtMTP4, Medtr3g080090; MtMTP5, Medtr7g093290; MtMTP6, Medtr1g088870; MtMTP7, Medtr4g008150; MtMTP8, Medtr3g062610; MtMTP9, Medtr2g064405; MtMTP10, Medtr8g046550; MtMTP11, Medtr7g022890; MtMTP12, Medtr6g463330 y MtMTP13, Medtr5g075680.

Con el fin de explorar la similitud de las proteínas de *M. truncatula* con otras ya descritas, se alinearon los 13 transportadores MTP de *M. truncatula* con sus ortólogos de *A. thaliana*, *O. sativa*, *Cucumis sativus*, *A. halleri*, *P. trichocarpa* y *Hordeum vulgare*, y se generó un árbol que mantiene la misma distribución que otros descritos con anterioridad (Montanini *et al.*, 2007), donde cada clado agrupa a proteínas con la misma afinidad de sustrato (Figura 42A). El clado mejor caracterizado se conoce como clado 1, y recoge las proteínas denominadas como Zn-MTPs (Gustin *et al.*, 2011) entre las que se encuentran los transportadores de *A. thaliana* AtMTP1 – AtMTP5 y AtMTP12. Sin embargo, aparte de transportar Zn^{2+} (AtMTP1, AtMTP3, AtMTP5 y AtMTP12; MtMTP1) (Arrivault *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Fujiwara *et al.*, 2015; Kobae *et al.*, 2004), también transportan Co^{2+} (AtMTP3) (Arrivault *et al.*, 2006), Fe^{2+} y Cd^{2+} (OsMTP1) (Menguer *et al.*, 2013). Los MTP del siguiente clado, se han designado mediante ensayos bioinformáticos como transportadores de hierro y zinc (Montanini *et al.*, 2007). En él, se encuentran las proteínas MTP6 y MTP7 de *A. thaliana* y *M. truncatula*, y MTP2 de *O. sativa*. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que demuestren su afinidad por uno u otro sustrato. El último clado engloba a proteínas con capacidad de transportar Mn^{2+} , como AtMTP8 (Pedas *et al.*, 2008), OsMTP8.1 (Chen *et al.*, 2013) o AtMTP11 (Delhaize *et al.*, 2007).

Figura 42: Diversidad de transportadores MTP en *M. truncatula* y expresión de MtMTP2. A) Árbol filogenéticos de todos los miembros de la familia MTP de *M. truncatula*, y homólogos de otras plantas. B) Expresión de MtMTP2 en partes aéreas y raíces de plantas fertilizadas con nitrato amónico, partes aéreas, raíces y nódulos de plantas inoculadas con *S. meliloti*. Cada valor es la media de al menos tres experimentos biológicos independientes $\pm$ SD.

Con el fin de identificar qué transportadores MTP intervienen durante la simbiosis con *S. meliloti*, se llevó a cabo un estudio sobre transcriptomas de nódulos de *M. truncatula*. Entre los MTPs de *M. truncatula*, se escogió *MtMTP2* para su caracterización por presentar la mayor expresión en nódulo entre los MTPs expresados en este órgano. Se comprobó la expresión de *MtMTP2* por medio de PCR cuantitativa a tiempo real, en parte aérea y raíz de plantas suplementadas con una fuente exógena de nitrógeno, y en parte aérea, raíz y nódulos de plantas inoculadas con *S. meliloti*. El órgano donde mayor expresión presentaba *MtMTP2* se confirmó que era el nódulo (Figura 42B). *MtMTP2* se expresa también en parte aérea cuando las plantas son fertilizadas con nitrato amónico en la solución de riego, pero esta expresión en parte aérea disminuyó cuando las plantas fueron inoculadas con *S. meliloti* (Figura 42B).

MtMTP2 interviene en la extrusión de zinc desde el citoplasma

Las proteínas MTP previamente descritas se caracterizan por poseer 6 dominios transmembrana, extremos N y C terminales citoplásmicos, una región rica en histidinas entre los dominios transmembrana IV y V, y un dominio característico en el C terminal (Montanini *et al.*, 2007). *MtMTP2* comparte todas las características proteicas típicas de su familia (Figura 43A), por lo que se puede prever una función similar a otros MTP descritos. Como se puede ver en la Figura 43A, las proteínas del clado I del árbol filogenético, entre las que se encuentran *MtMTP1* y *MtMTP2*, se conocen como Zn-MTPs (Gustin *et al.*, 2011).

Para poder conocer el rango de sustratos susceptibles de ser transportados por *MtMTP2*, se realizaron ensayos de complementación heteróloga en cepas de *S. cerevisiae* mutadas en distintos transportadores de metales. Para identificar el sustrato de transporte de *MtMTP2*, se testó su tolerancia frente a los tres sustratos más comunes de las proteínas MTP: zinc, hierro y manganeso (Chen *et al.*, 2009; Pedas *et al.*, 2014). Con este propósito, la secuencia codificante de *MtMTP2* se clonó en pYPGE15 bajo el control del promotor constitutivo de la *fosfoglicerato quinasa* de *S. cerevisiae*. Esta construcción fue posteriormente introducida en el mutante $\Delta zrt1 \Delta cot1$ de *S. cerevisiae* para ensayos de tolerancia a zinc (MacDiarmid *et al.*, 2000). La cepa tiene abolidos los dos transportadores de introducción de zinc en la vacuola, siendo *ZRT1* y *COT1* genes homólogos entre sí. Para testar la sensibilidad a zinc, la cepa transformada portando la secuencia codificante de *MtMTP2* clonada en pYPGE15, se creció en medio SD suplementado con 0 ó 500 μM de ZnSO_4 (Figura 43B). Como control negativo, la cepa mutante $\Delta zrt1 \Delta cot1$ se transformó con el vector vacío. El mutante que expresaba *MtMTP2* creció al nivel de la cepa parental

en las condiciones testadas, devolviendo la capacidad a la cepa mutante de crecer en condiciones elevadas de zinc.

Figura 43: Determinación del sustrato de MtMTP2 en levadura. A) Topología de MtMTP2. B) Complementación con zinc, hierro o manganeso. Las cepas parentales (fila superior) se transformaron con el plásmido vacío. Los mutantes $\Delta\text{zrt1}\Delta\text{cot1}$, Δccc1 y Δsmf1 , se transformaron con el plásmido vacío o conteniendo la secuencia codificante de MtMTP2. Diluciones seriadas de los transformantes (1:10) se plaquearon en medio selectivo (SD) con distintas concentraciones de ZnSO_4 , FeSO_4 o MnCl_2 .

Para evaluar la capacidad de MtMTP2 de transportar hierro, la secuencia codificante de *MtMTP2* se clonó en pDR196, bajo el control del promotor de la H⁺-ATPasa (PMA1) de *S. cerevisiae*, y se introdujo en la cepa mutante $\Delta ccc1$, afectada en la incorporación de hierro hacia la vacuola (Li *et al.*, 2001). MtMTP2 no restauró el fenotipo original (Figura 43B). La misma construcción se introdujo en la cepa $\Delta smf1$, que posee el transportador que introduce manganeso en la vacuola mutado (Supek *et al.*, 1996). MtMTP2 tampoco es capaz de restaurar el fenotipo silvestre. De este modo, MtMTP2 sólo es capaz de restaurar la capacidad de detoxificar zinc, por lo que consideraremos que este transportador se encuentra principalmente extrayendo zinc desde el citoplasma, pero no hierro ni manganeso.

MtMTP2 se localiza en las zonas de diferenciación-fijación

MtMTP2 se expresa principalmente en el nódulo y es capaz de exportar zinc desde el citoplasma. Para conocer donde ocurre la expresión de *MtMTP2* en los tejidos de nódulo y raíz, se transformaron plantas de *M. truncatula* con una cepa de *A. rhizogenes* ARqua1 que portaba el promotor de *MtMTP2* fusionado al gen GUS. Como secuencia promotora se consideró el fragmento de 879 pb aguas arriba del codón de inicio. Las plantas transformadas se inocularon con *S. meliloti* y tras 28 días post inoculación, raíces y nódulos se incubaron con X-Gluc.

Se pudo apreciar actividad GUS a lo largo de las zonas de diferenciación y fijación de nitrógeno del nódulo (Figura 44A), comenzando en zona II temprana e incrementando su intensidad hasta un máximo que se asociaba a zona II distal (Figura 44B). Por el contrario, la expresión de *MtMTP2* en raíz era muy baja, pero se concentraba en epidermis y el interior del cilindro vascular (Figura 44C, D). Este patrón de expresión coincidía con el descrito en Symbimics (Figura 44E), la base de datos que recoge el transcriptoma de células microdisecionadas de nódulo (Roux *et al.*, 2014).

Figura 44: Expresión tisular de MtMTP2 en raíz y nódulo. A) Tinción GUS en raíz y nódulo de *M. truncatula* transformados con el gen *gus* bajo el promotor de MtMTP2 a los 28 dpi. Barra de escala = 500 μm . B) Sección longitudinal de nódulo transformado con el gen *gus* bajo el promotor de MtMTP2 a los 28 dpi. Barra de escala = 50 μm . C) Sección longitudinal de raíz de plantas transformadas con el gen *gus* bajo el promotor de MtMTP2. Barra de escala = 100 μm . D) Sección trasversal de raíz de plantas transformadas con el gen *gus* bajo el promotor de MtMTP2 a los 28 dpi. Barra de escala = 50 μm . E, Expresión de MtMTP2 en nódulos de *M. truncatula* analizados por microdissección láser acoplada a RNAseq. Información obtenida de la base de datos Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>). ZI significa Zona I; ZII-d, Zona II distal; ZII-p, Zona II proximal; IZ, Interzona; y ZIII, Zona III.

Para corroborar que el patrón de expresión génica se mantiene a nivel de proteína, y determinar la localización a nivel celular de MtMTP2, se transformaron plantas de *M. truncatula* con la secuencia génica completa de *MtMTP2* dirigida bajo su propio promotor, siendo éste el mismo que el usado para actividad GUS. La secuencia completa de *MtMTP2* se fusionó a GFP en su extremo carboxilo terminal. Las plantas transformadas fueron inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente DsRED (Figura 45). Los nódulos generados tras 4 semanas post inoculación fueron recogidos y cortados en secciones de 100 μm para su posterior visualización. Para una mayor concreción de la zonación del nódulo, las secciones se tiñeron con DAPI. En estas secciones, MtMTP2 marcado con GFP se detectaba desde la zona II a la zona III temprana de nódulo, donde no se encontraba asociado a ningún tipo celular concreto.

Figura 45: Localización tisular de la expresión de MtMTP2. Se usó una fusión del promotor de *MtMTP2* con GFP (verde, panel superior izquierdo). Las plantas se inocularon con *S. meliloti* expresando constitutivamente DsRED (rojo, panel superior derecho). El ADN se marcó con DAPI (azul, panel inferior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron junto con la imagen del mismo nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala = 150 μm .

Para confirmar el patrón de localización de la proteína MtMTP2, se realizó un segundo ensayo donde la secuencia génica de *MtMTP2* y su promotor se clonaron en *A. rhizogenes* Arqua1, esta vez marcados con tres epítomos HA en el extremo C terminal. Las plantas transformadas con dicha construcción se inocularon con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP.

Figura 46: Localización de MtMTP2 en nódulo. A) Localización de MtMTP2 en nódulo. A) Localización de MtMTP2 fusionado a un epítopo 3xHA (panel inferior izquierdo), noduladas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP (panel superior derecho). El ADN se tiñó con DAPI (panel superior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron con otra imagen del mismo nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala, 200 μm . B) Ampliación de las secciones longitudinales de nódulos de *M. truncatula* inoculados con *S. meliloti* expresando GFP (panel superior derecho), de plantas transformadas con MtMTP2 bajo su propio promotor fusionado a un epítopo 3xHA (panel inferior izquierdo). El ADN se marcó con DAPI (panel superior izquierdo). Barra de escala, 25 μm .

A los 28 días post inoculación, raíces y nódulos se recogieron, fijaron, cortaron en secciones de 100 μm y marcaron inmunohistoquímicamente. El epítipo HA se detectó con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 594 (rojo). El ADN se tiñó con DAPI para una mejor concreción de la imagen. Al igual que en el ensayo anterior, la señal de MtMTP2 se localizó en las zonas de infección-diferenciación y fijación (Figura 46). En células donde se estaba produciendo la infección o habían desarrollado bacteroides, MtMTP2 aparecía por la totalidad de la célula. La señal en raíz era prácticamente indetectable en las condiciones con que se analizaron las muestras de nódulo (Figura 47).

Figura 47: Sección transversal de raíz transformada con MtMTP2-HA. El panel izquierdo el ADN teñido con DAPI. El panel central muestra la señal de MtMTP2-HA marcado con un anticuerpo conjugado con Alexa594 (rojo); El panel de la derecha muestra la superposición de los dos paneles anteriores junto con una imagen del mismo corte bajo transiluminación. Barra de escala = 100 μm .

MtMTP2 se requiere para una correcta fijación de nitrógeno

Con el fin de determinar cómo influye MtMTP2 en la simbiosis de *M. truncatula* con *S. meliloti*, se analizó el fenotipo en dos líneas mutantes independientes. Se recibieron las líneas NF11171 y NF18305 desde la colección de la Samuel Roberts Noble Foundation (Ardmore, EEUU), a las que designaremos de aquí en adelante como *mtp2-1* y *mtp2-2*, respectivamente (Figura 48A). Ambas están generadas por la inserción de un elemento transponible de *N. tabacum* (Tnt1) (Tadege *et al.*, 2008), en el nucleótido -69 respecto al ATG en el caso de *mtp2-1* y en el +623 en el caso de *mtp2-2*. Al amplificar el transcrito al completo en ambos mutantes de MtMTP2 por qRT-PCR, se observó una disminución de la transcripción del 82 % en *mtp2-1*, por lo que se consideró a *mtp2-1* como knock-down, y del 98 % en *mtp2-2*, por lo se consideró knock-out (Figura 48B).

Figura 48: Fenotipo de mutantes en MtMTP2 en simbiosis. A) Posición de las inserciones de *Tnt1* en *mtp2-1* (NF11171) y *mtp2-2* (NF18305). B) qRT-PCR de la expresión de MtMTP2 en raíz denodulada y nódulo de plantas control, *mtp2-1* y *mtp2-2*. La expresión del gen de la Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa (MtUbi) de *M. truncatula* se usó para estandarizar la expresión de cada muestra. C) Crecimiento de plantas representativas de cada línea. Barra de escala = 1 cm. D) Biomasa expresada como peso seco de raíces y partes aéreas. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=15$ plantas. E) Vista en detalle de nódulos control, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Barra de escala = 1 mm. F) Número de nódulos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=15$ plantas. 100% = 10,31 nódulos/planta. G) Actividad nitrogenasa por gramo de nódulo. Los resultados son la media $\pm$ SD de 3 réplicas de un pool de 5 plantas.

Al ser el nódulo el principal órgano de expresión de MtMTP2, se evaluó el fenotipo de *mtp2-1* y *mtp2-2* en condiciones de simbiosis con *S. meliloti* 2011. Tras 28 días post inoculación, se observó una reducción de la biomasa en la parte aérea de ambas líneas, pero no en raíz (Figura 48C). El número de nódulos total incrementó un 50 % en *mtp2-1* y un 60 % en *mtp2-2* (Figura 48E). Los nódulos de *mtp2-1* son mayoritariamente rojos, siendo un 10 % del total blancos. El mutante knock-out (*mtp2-2*) presentaba la totalidad de sus nódulos blancos (Figura 48D). La actividad nitrogenasa medida a través del ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968), se redujo en un 50 % en el caso de *mtp2-1* y en un 90 % en *mtp2-2*.

Como *MtMTP2* se expresaba, aunque en menor medida en raíces, se analizó el fenotipo de los mutantes en condiciones no simbióticas, cuando el nitrógeno se proporciona en la solución de riego como nitrato amónico. En este caso, se realizaron los mismos ensayos de tamaño y biomasa en plantas de 28 días fertilizadas en la solución de riego con nitrato amónico. En condiciones no simbióticas, tanto *mtp2-1* como *mtp2-2* no presentaban diferencias significativas de tamaño o biomasa en comparación con el silvestre (Figura 49).

Figura 49: Fenotipo de *mtp2-1* y *mtp2-2* en condiciones no simbióticas. A) Crecimiento de plantas representativas control, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Barra de escala = 1 cm. B) Biomasa de raíces y partes aéreas. Cada medida es el resultado de la media $\pm$ SD de $n = 15$ plantas.

DISCUSIÓN

La fijación simbiótica de nitrógeno usa un gran número de metaloproteínas para llevar a cabo esta reacción compleja y energéticamente cara (Brear *et al.*, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2014). De este modo, estudiar cómo los metales de transición se transfieren desde la planta hospedadora a los rizobios fijadores de nitrógeno en el interior de las células del nódulo es relevante, especialmente en el contexto actual de introducir la capacidad de fijar nitrógeno en plantas no-leguminosas (Vicente & Dean, 2017). En este sentido, un importante esfuerzo se ha realizado para entender cómo el hierro llega al nódulo y es liberado en el apoplasto de la zona II del nódulo (Rodríguez- Haas *et al.*, 2013; Tejada-Jiménez *et al.*, 2015), en un proceso que muy probablemente involucre a citrato (Takanashi *et al.*, 2013), en identificar a los transportadores de hierro involucrados en su transporte a través de las distintas membranas para llegar al simbiosoma (Hakoyama *et al.*, 2012; Tejada-Jiménez *et al.*, 2015), y en la descripción de los mecanismos requeridos para tamponar este hierro (Kaiser *et al.*, 2003; Zielazinski *et al.*, 2013). En contraste a esto, se conoce menos en lo concerniente al transporte de cobre y zinc en esta simbiosis, aspectos que han sido abordados en la presente Tesis Doctoral.

Transporte de cobre entre *M. truncatula* y sus endosimbiontes asociados

El cobre está involucrado en múltiples procesos fisiológicos de la planta: transducción de energía (citocromo oxidasa) (Buse *et al.*, 1999), metabolismo de la pared (lacasas) (Dwivedi *et al.*, 2011), metabolismo de radicales libres (superóxido dismutasa) (Tainer *et al.*, 1983), control hormonal (receptor de etileno) (Rodríguez *et al.*, 1999), y biosíntesis de cofactores (Cnx1) (Kuper *et al.*, 2004). Las deficiencias de cobre causan alteraciones en el desarrollo de las plantas, asociadas a la reducción en las tasas de fotosíntesis y a la producción de pared celular (Marschner, 2011; Römhild & Marschner, 1991). También es perjudicial para la fijación simbiótica de nitrógeno (Hallsworth, 1960; Seliga, 1993; Snowball *et al.*, 1980), un proceso probablemente asociado con una menor actividad citocromo c oxidasa en los bacteroides. Estos realizan un metabolismo aeróbico a concentraciones de O₂ extremadamente bajas, que requieren de una citocromo oxidasa con gran afinidad por el oxígeno: la citocromo oxidasa cbb3 (Preisig *et al.*, 1996a). Este complejo enzimático, codificado por el operon *fixNOQP*, posee cofactores de hierro y cobre. Este último cofactor es proporcionado por un subgrupo de Cu⁺-ATPasas (FixI en rizobios) (Kahn *et al.*, 1989), que sacan cobre del citosol del bacteroide al periplasma. Tanto *fixNOQP* como *fixGHIS* se expresan exclusivamente en los bacteroides y no en rizobios en vida libre (Preisig *et al.*, 1996b), indicando un papel en la adaptación a un estilo de vida endosimbiótico.

Sin embargo, pese a que sabemos cómo transfieren cobre los bacteroides a las citocromos oxidasas, menos se conoce sobre cómo este metal es entregado por la planta hospedadora al bacteroide. Por analogía a como se entrega el hierro (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013), se puede hipotetizar que el cobre es llevado por los vasos y liberado al apoplasto de la zona de infección/diferenciación del nódulo. A continuación, un transportador de cobre de la membrana plasmática introduciría este elemento en la célula, y posteriormente sería transferido a los bacteroides a través de la membrana del simbiosoma. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indican que MtCOPT1 es la proteína responsable de la incorporación del cobre apoplástico.

MtCOPT1 es un transportador de cobre presente exclusivamente en nódulos. Los ensayos de complementación de levaduras mutantes indican que está involucrado en la captación de cobre. Los estudios con fusiones promotor de *MtCOPT1::gus/gfp* sugieren que esta función la realizan desde la zona tardía de infección/diferenciación a la zona temprana de fijación, donde hipotetizamos que se libera el cobre transportado al nódulo. Datos de transcriptómica de células microdisecionadas de las distintas zonas del nódulo, y disponibles en la base de datos Symbimics (Roux *et al.*, 2014) validan los resultados de las fusiones transcripcionales. Además, el papel putativo de MtCOPT1 introducir cobre en las células de los nódulos está también refrendado por la localización de la proteína MtCOPT1 en la periferia, probablemente la membrana plasmática, de las células del nódulo. Esta localización subcelular se confirmó mediante la colocalización de MtCOPT1 con un marcador de la membrana plasmática en hojas de *N. benthamiana*.

El crecimiento de la planta en condiciones simbióticas, cuando el nitrógeno es proporcionado por los rizobios de los nódulos, depende de la actividad MtCOPT1, como se indica por la reducción de la producción de biomasa en plantas *copt1-1*, cuando se comparan con las silvestres. Esto es el resultado de una reducción de entorno el 50% de la actividad nitrogenasa, y no a alteraciones en el desarrollo del nódulo, dado que no se detecta ningún cambio en la morfología de los mismos. Este fenotipo es causado por la inserción de un *Tnt1* en *MtCOPT1* y no por la inserción de otra copia del transposón en otra región del genoma de las plantas *copt1-1*, dado que la transformación de estos mutantes con una copia silvestre del gen y regulado por su propio promotor restauró el fenotipo de crecimiento silvestre y la actividad nitrogenasa en las plantas *copt1-1*. Sin embargo, MtCOPT1 transporta Cu^+ , y no hay ninguna evidencia en la literatura de un transportador de la familia COPT/Ctr que sea capaz de transportar hierro o molibdeno, los dos cofactores metálicos de la nitrogenasa (Miller *et al.*, 1993). Por tanto, MtCOPT1 ejerce un efecto indirecto sobre la fijación de nitrógeno, en un mecanismo dependiente de cobre. Esta idea se ve

apoyada por la restauración del fenotipo silvestre en plantas *copt1-1* regadas con una solución de riego enriquecida en cobre.

Uno de los procesos probablemente afectados por la alteración de la homeostasis de cobre en el nódulo es la actividad citocromo oxidasa *cbb3* de los bacteroides. Una alteración en la función de esta enzima resultaría en una reducción del metabolismo energético y en una alteración en los niveles de oxígeno libre, ambos con efectos negativos en la actividad nitrogenasa. Así, una mutación en el operon *fixNOQP* de *B. japonicum* causa un fenotipo fix^- (Preisig *et al.*, 1996a). Resultados similares se pueden obtener mutando la Cu^+ -ATPasa *fixI*, que proporciona cobre a esta enzima (Kahn *et al.*, 1989; Raimunda *et al.*, 2011). Los bacteroides aislados de plantas *copt1-1* también mostraron una reducción significativa en la actividad citocromo oxidasa, que podría resultar de la reducción del aporte de cobre a los bacteroides. Sin embargo, el fenotipo *copt1-1* no es tan severo como el de los mutantes *fixI* o *fixN*, dado que aún queda un 50% de la actividad nitrogenasa del nódulo, y no hay alteraciones en el desarrollo. Esto indica que MtCOPT1 no es el único transportador de cobre de estas células. MtCOPT2, el homólogo con mayor similitud, podría ser un candidato, pero no se expresa en estas condiciones. Otro candidato, sería MtCOPT3, el único otro COPT que se expresa en nódulos, pero su expresión no está afectada por la mutación de *MtCOPT1*. Además, *MtCOPT3* se expresa por toda la planta lo que sugiere un papel independiente de la fijación de nitrógeno. Otros candidatos podrían ser miembros de las familias YSL, ZIP, o Nramp (Nevo & Nelson, 2006; Schikora *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2012).

Si bien MtCOPT2 no participaría en la homeostasis de cobre en plantas noduladas o fertilizadas con nitrógeno, sí jugaría un papel importante en la interacción con hongos formadores de micorrizas arbusculares, dado que es el único transportador de esta familia específico de raíces micorrizadas. El parecido de las secuencias de MtCOPT1 y MtCOPT2 podría indicar que a lo largo del desarrollo evolutivo de *M. truncatula* hubo un evento de duplicación y de diferenciación funcional del transportador de cobre ancestral que podría servir para ambos tipos de endosimbiosis. Dado que la ruta de señalización de la nodulación se originó de la previamente existente para el establecimiento de micorrizas arbusculares (Genre & Russo, 2016; Oldroyd, 2013), se podría especular con que MtCOPT1 se originó a partir de MtCOPT2. Estudios más detallados de la homeostasis de cobre en otras leguminosas serían necesarios para determinar si esta duplicación fue resultado de un accidente evolutivo específico de *M. truncatula*, o forma parte de una estrategia específica de la adaptación a la formación de nódulos.

La localización de MtCOPT2 exclusivamente en células que contienen arbusculos y su capacidad de introducir cobre en la célula, sugieren un papel en la

captación de cobre en la interfaz hongo-planta. De este modo, sería el primer transportador de metales que mediaría la captación de oligonutrientes metálicos y se sumaría a los ya descritos para fosfato (MtPT4) (Harrison *et al.*, 2002) o amonio (MtAMT2.3) (Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015). Aún estaría por determinar la importancia de este transportador en la nutrición de cobre de plantas micorrizadas. Sin embargo, no existe mutante en *MtCOPT2* disponible en la colección de la Noble Foundation (Tadege *et al.*, 2008), y si bien se han realizado silenciamiento génico mediante amiARN, estos análisis están aún en curso. Sin embargo, por analogía a lo que ocurre en la nutrición de fosfato o amonio (Javot *et al.*, 2007), cabría esperar una reducción en la expresión de otros transportadores de cobre situados en la epidermis de la raíz.

De este modo, se puede proponer un modelo en que una planta, estando micorrizada y nodulada, recibiría el cobre del arbúsculo a través de *MtCOPT2*, desde donde simplástica- o apoplásticamente llegaría a la endodermis. Allí, P_{1b} -ATPasas análogas a HMA5 de *Arabidopsis* (Andrés-Colas *et al.*, 2006, Kobayashi *et al.*, 2008) podrían mediar la transferencia a los vasos, por donde el cobre llegaría hasta órganos sumideros. En el caso del nódulo, el cobre sería liberado en la zona de infección/diferenciación, acumulándose en el apoplasto. Este cobre sería introducido en la célula por *MtCOPT1*, y mediante Cu^{+} -chaperonas ser transferido a una P_{1b} -ATPasa que lo transportaría al interior del simbiosoma. La identidad de esta Cu^{+} -ATPasa está aún por determinar, ya que a pesar de que hay varios miembros de la familia que se expresan en nódulo, no hay ningún candidato que se induzca claramente este órgano. Una vez en espacio peribacteroidal, el cobre entraría en el bacteroide a través de transportadores aún desconocidos, donde, mediado por FixI pasaría a formar parte de la citocromo oxidasa *cbb3* (Preisig *et al.*, 1996b).

Homeostasis de zinc en el nódulo de *M. truncatula*

Como se indicó en la introducción a esta Tesis Doctoral, el zinc es un nutriente limitante para las plantas en muchas zonas del mundo (Alloway *et al.*, 2013). Esta limitación tiene efectos negativos en el crecimiento de las plantas, en los rendimientos agrícolas, y en su valor nutritivo (Alloway *et al.*, 2009; Broadley *et al.*, 2007). Esto se agrava en las leguminosas dado que el nódulo es un sumidero adicional, que requiere de cantidades relativamente grandes de este nutriente limitante (Shukla *et al.*, 1972; Shukla & Yadav, 1982). Por ello, para optimizar la captación de este nutriente hemos caracterizado la vía de entrega de zinc a los nódulos fijadores de nitrógeno. Por analogía a lo observado para hierro y para cobre (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013; Tejada-Jimenez *et al.*, 2015), se hipotetizó que el zinc iba a ser entregado también en la zona de infección-diferenciación del nódulo, y que

un transportador de Zn^{2+} libre, no Zn^{2+} -NA mediaría este proceso, es decir, sería un transportador de la familia ZIP. En análisis previos del transcriptoma de nódulos de *M. truncatula* realizados en el laboratorio en el que se realizó esta Tesis Doctoral, se identificó a MtZIP6, como un posible candidato a realizar esta función.

Estudios previos mostraron que MtZIP6 es un transportador ZIP capaz de introducir hierro y zinc en el citosol cuando se expresa en levaduras (López-Millán *et al.*, 2004). Esta proteína se localiza en la estela de la raíz, y en la zona apical del nódulo. MtZIP6 se localiza en la membrana plasmática de células infectadas con *S. meliloti* en la zona de diferenciación del nódulo, como se ha podido mostrar tanto en estudios sobre datos transcriptómicos de células microdisecionadas (Roux *et al.*, 2014), como en los estudios histoquímicos y de inmunolocalización realizados en este trabajo. Además, cuando los niveles de transcritos de *MtZIP6* se silenciaban con ARNi, la fijación de nitrógeno se reducía significativamente (un 90 %). Estos datos apoyan el hecho de que MtZIP6 juegue un papel importante en la fijación simbiótica de nitrógeno. Sin embargo, no indican la naturaleza del sustrato transportado *in planta*, es decir, si MtZIP6 está introduciendo zinc en la célula o, por el contrario, si es un análogo funcional al transportador de hierro MtNramp1 (Tejada-Jimenez *et al.*, 2015).

La información disponible sugiere que, en condiciones fisiológicas, MtZIP6 es principalmente un transportador de zinc. La acumulación de zinc observada en la zona apical de los nódulos silenciados por ARNi en *MtZIP6* es consistente con un modelo en el que la reducción de los niveles de MtZIP6 impediría el transporte de zinc a través de la membrana plasmática de la zona de diferenciación del nódulo, lo que causaría la acumulación de zinc en la zona previa a la región donde actúa MtZIP6. También explicaría porqué no se observa complementación cuando se suplementa con zinc la solución nutritiva: simplemente se acumularía en el apoplasto y poco alcanzaría el citosol de la célula. Por el contrario, MtZIP6 no jugaría ningún papel en la distribución de hierro en nódulos. No se observa ningún cambio en la concentración de hierro o en su distribución en plantas silenciadas en *MtZIP6* comparadas con sus controles, al contrario de lo que pasa en los mutantes *mntnramp1-1* y *ljmate1*, ambos afectados en la homeostasis de hierro (Takanashi *et al.*, 2013; Tejada-Jiménez *et al.*, 2015). De este modo, la capacidad de MtZIP6 de introducir hierro en el citosol de levaduras podría ser el resultado de sobreexpresar un transportador con una baja afinidad por hierro. Este transportador, ante un medio muy selectivo, podría transportar hierro, un fenómeno que no es inusual cuando se realizan ensayos de expresión heteróloga en levaduras.

De este modo, la reducción de la actividad nitrogenasa observada no es un resultado directo de la falta de un cofactor de la nitrogenasa, sino de la pérdida de

una o más funciones dependientes de zinc en el nódulo. Dado que MtZIP6 simplemente introduce zinc en la célula, múltiples procesos podrían estar afectados (enzimas, factores de transcripción, proteínas estructurales) (Bashir *et al.*, 2016; Sinclair & Krämer, 2012), y el fenotipo observado podría emerger de complejos fenómenos pleiotrópicos. De hecho, en los transcriptomas de nódulos publicados se pueden encontrar múltiples genes que codifican a zinc-proteínas expresados en estos órganos (Astudillo-Reyes *et al.*, 2015; Benedito *et al.*, 2008; Limpens *et al.*, 2013). De este modo, atribuir este fenotipo a una proteína específica es extremadamente difícil teniendo en cuenta nuestro conocimiento actual sobre el zinc-proteoma del nódulo y las técnicas disponibles para analizarlo. No obstante, el fenotipo observado en plantas noduladas silenciadas en *MtZIP6* es consistente con el observado en soja inoculada con el mutante *znuA* de *S. fredii* que carece de un transportador de alta afinidad de zinc (Jiao *et al.*, 2016), cuyo homólogo en *S. meliloti* se expresa principalmente en la interzona del nódulo (Vahling-Amstrong *et al.*, 2012). Esto sugeriría que el requerimiento de zinc para la fijación simbiótica de nitrógeno es de origen bacteriano. Entre todas las posibilidades, es poco probable que se deba a algún factor de transcripción bacteriano dependiente de zinc que regule la expresión de la nitrogenasa, dado que los niveles de esta proteína no sufren cambios significativos entre las plantas silenciadas y las controles. Sin embargo, trabajo adicional con mejores técnicas para estudiar el zinc-proteoma del nódulo será necesario para poder dilucidar con precisión las bases moleculares del fenotipo observado.

MtZIP6 también se expresa en los vasos de la raíz, en el parénquima del xilema. Los resultados obtenidos indican que una reducción del 90% de la expresión de *MtZIP6* no son suficiente para alterar el crecimiento cuando las plantas se riegan con una solución nutritiva que contiene nitrato amónico. Esto podría ser debido a que *MtZIP6* produjera un ARNm muy estable que se pudiera traducir en proteína suficiente como para que MtZIP6 realizara su función, o que haya otro transportador capaz de complementar funcionalmente a MtZIP6 en los vasos. Además, el fenotipo observado en las plantas silenciadas inoculadas con *S. meliloti* no resulta de problemas en la expresión de *MtZIP6* en las raíces, dado que, si éste fuera el caso, llegaría menos zinc a los nódulos, y lo que ocurre es lo contrario.

En el nódulo, *MtZIP6* sólo se expresa en células infectadas con rizobio, observación que se ha verificado en datos publicados de transcriptómica comparativa de células infectadas y no infectadas (Limpens *et al.*, 2013). Por tanto otros transportadores, YSL o ZIP, podrían participar en la captación de zinc por células no infectadas del nódulo. En base a los datos de transcriptómica disponibles, posibles candidatos sería MtZIP1, MtZIP4, o MtZIP7, que son los miembros de la familia ZIP

que se expresan principalmente en células no infectadas del nódulo (Limpens *et al.*, 2013).

Una vez que el zinc está en el citosol, ha de pasar a los bacteroides para poder ser usado por estos. Para ello, se requiere de un transportador capaz de transportar zinc hacia afuera del citosol, siendo candidatos miembros de las familias CDF/MTP (Kolaj-Robin *et al.*, 2015) o Zn^{2+} -ATPasas (Argüello *et al.*, 2007). En los análisis de transcriptoma previos realizados por el grupo, no se encontró ningún miembro de estas familias que fuera específico de nódulos, pero sí un MTP, MtMTP2, que se inducía en el nódulo.

Ensayos de complementación en levaduras mutantes indican que MtMTP2 es capaz de sacar zinc del citosol, por lo que podría ser capaz de translocar zinc a través de la membrana del simbiosoma. Consistente con esta posible función, *MtMTP2* se expresa en estadíos de desarrollo posteriores a *MtZIP6*, lo que podría reflejar una sucesión temporal en su función. Además, MtMTP2 se localiza en compartimentos intracelulares. Sin embargo, a la resolución disponible por microscopía confocal no se puede asegurar que se localice en la membrana simbiosomal o en algún otro orgánulo. Para ello, se realizarán futuros estudios de inmunolocalización en microscopio electrónico usando anticuerpos unidos a oro coloidal.

Independientemente de su localización exacta, MtMTP2 juega un papel muy relevante en el desarrollo del nódulo, como indica el descenso en la actividad nitrogenasa y la falta de maduración de los nódulos en los mutantes *mtp2-1* y *mtp2-2*, dos alelos mutantes en el mismo gen. De hecho, la respuesta de la actividad nitrogenasa sigue a grandes rasgos los niveles de expresión de *MtMTP2*. Así, en el alelo *mtp2-1*, en el que *MtMTP2* sólo es silenciado, se detecta algo de actividad nitrogenasa y los nódulos se desarrollan; mientras que el alelo *mtp2-2*, KO para *MtMTP2*, no desarrolla nódulos funcionales.

Mientras que *MtMTP2* es crítico para el desarrollo del nódulo, no parece realizar ninguna función esencial en condiciones en las que la simbiosis no es necesaria, pese a que se expresa en los vasos de la raíz. Esto, como en el caso de *MtZIP6*, puede ser debido a la existencia de redundancia funcional, y que otro transportador colabore en la función realizada por MtMTP2. Otra alternativa, podría ser que, en el proceso evolutivo de desarrollo de nódulos, se duplicaran algunos genes implicados en la homeostasis de metales, y que, si bien pueden haber divergido en su patrón de expresión y sólo uno de ellos se haya especializado en la fijación de nitrógeno, aún sean funcionales en los vasos.

De este modo, se puede proponer un modelo donde las plantas de *M. truncatula* infectadas con *S. meliloti* recibirían zinc desde los vasos del nódulo, que

sería liberado en el apoplasto de la zona de diferenciación del nódulo e introducido en la célula infectada con rizobios mediante el transportador MtZIP6. Una vez en el citosol, MtMTP2 mediaría la translocación de zinc a través de la membrana simbiosomal o lo introduciría en otro orgánulo. En este último caso, el fenotipo observado se podría explicar como resultado de zinc proteínas que no recibieran su metal, donde MtMTP2 podría realizar una función parecida a la descrita para Msc2 en *S. cerevisiae* (Ellis *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2004). Si introdujera zinc en el simbiosoma, ZnuA de *S. meliloti* lo introduciría en el bacteroide (Vahling-Armstrong *et al.*, 2012), donde sería usado por proteínas implicadas en la funcionalidad o en la maduración de la nitrogenasa. Asimismo, análogos funcionales en *M. truncatula* al transportador GmZIP1 de *G. max* (Moreau *et al.*, 2002), podrían sacar del simbiosoma el exceso de zinc introducido, a modo de válvula de escape.

CONCLUSIONES

1. MtCOPT1 es un transportador de cobre específico de nódulo, con localización en la membrana plasmática de células infectadas y no infectadas de zona II y III. MtCOPT1 actúa suministrando cobre al nódulo y su mutación se relaciona con una disminución de la actividad nitrogenasa, que se restaura tanto cuando se suministra cobre exógenamente, como cuando se introduce de nuevo en el mutante una copia silvestre del gen *MtCOPT1*. Este descenso de la actividad nitrogenasa es el resultado probable de la reducción de la actividad citocromo oxidasa cbb3 de los bacteroides, y la consiguiente reducción del estado energético del bacteroide.
2. MtCOPT1 no es el único transportador de cobre responsable de introducir cobre en las células infectadas con rizobios, dado que no se logra reducir al 100% la actividad citocromo oxidasa de los bacteroides.
3. MtCOPT2 es un transportador de cobre con una alta similitud a MtCOPT1. La expresión de este gen es específica de células colonizadas con los arbúsculos característicos de las micorrizas arbusculares. Su ubicación y su capacidad de introducir cobre en la célula induce a pensar que mediaría la captación del cobre transportado por las hifas del hongo micorrízico y liberado en el espacio periarbuscular.
4. La similitud entre las secuencias de MtCOPT1 y MtCOPT2 y su expresión específica en endosimbiosis sugiere un evento de duplicación y diferenciación funcional para adaptarse a la aparición de la simbiosis con rizobios.
5. MtZIP6 es un transportador que introduce zinc a las células, con expresión en nódulo y raíz. Se localiza en la membrana plasmática de células del parénquima del xilema y en células infectadas con rizobio en las zonas II y III del nódulo. Si bien no parece realizar ninguna función esencial en plantas no noduladas, su mutación reduce la tasa de fijación de nitrógeno, a la vez que contribuye a la acumulación de zinc en el apoplasto de la zona de infección de los nódulos. Este fenotipo es el resultado de la pérdida de una o varias actividades que posibilitan la maduración o la función de la nitrogenasa, pero no de una alteración de los niveles de síntesis de la misma.

6. MtMTP2 es un transportador encargado de exportar zinc desde el citoplasma. Al igual que *MtZIP6* se expresa en los vasos de la raíz y en el nódulo, con mayor expresión en este último. En nódulos, MtMTP2 se localiza en un compartimento intracelular por definir. La mutación de *MtMTP2* supone una menor capacidad de formar nódulos funcionales, lo que refleja la importancia de una o varias zinc-proteínas en el desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany, S. E., Müller-Moulé, P., Niyogi, K. K., Pilon, M., & Shikanai, T. (2005). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell*, 17(4), 1233-1251.
- Aguirre, G., & Pilon, M. (2015). Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Frontiers in plant science*, 6.
- Albanese, S., Sadeghi, M., Lima, A., Cicchella, D., Dinelli, E., Valera, P., . . . De Vivo, B. (2015). GEMAS: cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe. *Journal of Geochemical Exploration*, 154, 81-93.
- Aller, S. G., Eng, E. T., De Feo, C. J., & Unger, V. M. (2004). Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53435-53441.
- Alloway, B. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537-548.
- Alloway, B. J. (2013). Bioavailability of elements in soil. In *Essentials of medical geology* (pp. 351-373).
- Álvarez-Fernández, A., Díaz-Benito, P., Abadía, A., López-Millán, A.-F., & Abadía, J. (2014). Metal species involved in long distance metal transport in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 105.
- Ando, Y., Nagata, S., Yanagisawa, S., & Yoneyama, T. (2013). Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds. *Functional Plant Biology*, 40(1), 89-100.
- Andres-Colas, N., Sancenon, V., Rodriguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., . . . Penarrubia, L. (2006). The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal*, 45(2), 225-236.
- Andriunas, F., Zhang, H.-M., Xia, X., Patrick, J. W., & Offler, C. E. (2013). Intersection of transfer cells with phloem biology—broad evolutionary trends, function, and induction. *Frontiers in plant science*, 4, 221.
- Antala, S., Ovchinnikov, S., Kamisetty, H., Baker, D., & Dempsey, R. E. (2015). Computation and functional studies provide a model for the structure of the Zinc transporter hZIP4. *Journal of Biological Chemistry*, 290(29), 17796-17805.
- Ané, J.-M., Kiss, G. B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E., Ayax, C., . . . Kalo, P. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, 303(5662), 1364-1367.
- Ané, J.-M., Lévy, J., Thoquet, P., Kulikova, O., de Billy, F., Penmetsa, V., . . . Cook, D. R. (2002). Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(11), 1108-1118.
- Aoyama, T., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nagasaka, S., Usuda, K., Kakei, Y., . . . Nishizawa, N. K. (2009). OsYSL18 is a rice iron (III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. *Plant molecular biology*, 70(6), 681-692.
- Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 443-478.
- Argüello, J. M., Eren, E., & González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals*, 20(3-4), 233-248.
- Argüello, J. M., Raimunda, D., & González-Guerrero, M. (2012). Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13510-13517.

- Arrivault, S., Senger, T., & Krämer, U. (2006). The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*, 46 (5), 861-879.
- Arunothayanan, H., Nomura, M., Hamaguchi, R., Itakura, M., Minamisawa, K., & Tajima, S. (2010). Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome c oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules. *Plant and cell physiology*, 51(7), 1242-1246.
- Astudillo-Reyes, C., Fernandez, A. C., & Cichy, K. A. (2015). Transcriptome Characterization of Developing Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Pods from Two Genotypes with Contrasting Seed Zinc Concentrations. *PLoS One*, 10(9), 137-157.
- Avenhaus, U., Cabeza, R. A., Liese, R., Lingner, A., Dittert, K., Salinas-Riester, G., . . . Schulze, J. (2015). Short-Term molecular acclimation processes of legume nodules to increased external oxygen concentration. *Frontiers in plant science*, 6.
- Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46(1), 84-101.
- Barberon, M., & Geldner, N. (2014). Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant physiology*, 166(2), 528-537.
- Bashir, K., Ishimaru, Y., & Nishizawa, N. K. (2010). Iron uptake and loading into rice grains. *Rice*, 3(2-3), 122-130.
- Bashir, K., Rasheed, S., Kobayashi, T., Seki, M., & Nishizawa, N. K. (2016). Regulating Subcellular Metal Homeostasis: The Key to Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1192
- Becher, M., Talke, I. N., Krall, L., & Kramer, U. (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, 37(2), 251-268.
- Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., . . . Ott, T. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 55(3), 504-513.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Genetics Microbiology*, 84(1), 188-198.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G. T., Grande, A., Yang, H., . . . Connolly, E. L. (2012). Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 738-761.
- Bernard, P., & Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology*, 226(3), 735-745.
- Bertani, G. (1951). STUDIES ON LYSOGENESIS I: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* 1. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Binder, A., Soyano, T., Hayashi, M., Parniske, M., & Radutoiu, S. (2014). Plant Genes Involved in Symbiotic Signal Perception/Signal Transduction. *The Lotus japonicus Genome* (pp. 59-71): Springer.
- Binder, B. M., Rodríguez, F. I., & Bleecker, A. B. (2010). The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37263-37270.
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2014). Lysosome-related organelles as mediators of metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28129-28136.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 695-700.

- Bouis, H. E., & Welch, R. M. (2010). Biofortification—a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *Crop Science*, 50, S-20-S-32.
- Bouwman, L., Goldewijk, K. K., Van Der Hoek, K. W., Beusen, A. H., Van Vuuren, D. P., Willems, J., . . . Stehfest, E. (2013). Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900–2050 period. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(52), 20882–20887.
- Brear, E. M., Day, D. A., & Smith, P. M. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Frontiers In Plant Science*, 4, 359.
- Breuillin-Sessoms, F., Floss, D. S., Gomez, S. K., Pumplin, N., Ding, Y., Levesque-Tremblay, V., . . . Eaglesham, J. B. (2015). Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter 4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2; 3. *The Plant Cell*, 27(4), 1352–1366.
- Brito, B., Palacios, J.-M., Hidalgo, E., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. (1994). Nickel availability to pea (*Pisum sativum* L.) plants limits hydrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae bacteroids by affecting the processing of the hydrogenase structural subunits. *Journal of bacteriology*, 176(17), 5297–5303.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677–702.
- Brumbarova, T., Bauer, P., & Ivanov, R. (2015). Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends in plant science*, 20(2), 124–133.
- Brunelli, J. P., & Pall, M. L. (1993). A series of yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/lox-mediated plasmid excision. *Yeast*, 9(12), 1309–1318.
- Burch-Smith, T. M., & Zambryski, P. C. (2012). Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Annual review of plant biology*, 63, 239–260.
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., & Blüggel, M. (1999). Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase. *Protein Science*, 8(5), 985–990.
- Catty, P., Boutigny, S., Miras, R., Joyard, J., Rolland, N., & Seigneurin-Berny, D. (2011). Biochemical characterization of AtHMA6/PAA1, a chloroplast envelope Cu (I)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36188–36197.
- Cerri, M. R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G. E., . . . 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(4), 2155–2172.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T. V., Radhakrishnan, G. V., Findlay, K., Soumpourou, E., . . . Morris, R. J. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352(6289), 1102–1105.
- Charpentier, M., Vaz Martins, T., Granqvist, E., Oldroyd, G. E., & Morris, R. J. (2013). The role of DMI1 in establishing Ca²⁺ oscillations in legume symbioses. *Plant signaling & behavior*, 8(2), e22894.
- Chen, B.D., Li, X.L., Tao, H.Q., Christie, P., and Wong, M.H. (2003). The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50, 839–846.
- Chen, M., Shen, X., Li, D., Ma, L., Dong, J., & Wang, T. (2009). Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11–12), 1089–1094.
- Chen, Z., Fujii, Y., Yamaji, N., Masuda, S., Takemoto, Y., Kamiya, T., . . . Maeshima, M. (2013). Mn tolerance in rice is mediated by MTP8. 1, a member of the cation diffusion facilitator family. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4375–4387.

- Cheng, H.-P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5183-5191.
- Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A., & Smith, P. (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Frontiers in plant science*, 5, 699.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., & Zur Nieden, U. (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18215-18221.
- Clemens, S., Deinlein, U., Ahmadi, H., Höreth, S., & Uraguchi, S. (2013). Nicotianamine is a major player in plant Zn homeostasis. *Biometals*, 26(4), 623-632.
- Clemens, S., & Weber, M. (2016). The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant Signal and Behaviour*, 11(2), e1114197.
- Cobine, P. A., Pierrel, F., & Winge, D. R. (2006). Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 759-772.
- Combier, J.-P., Frugier, F., De Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., . . . Crespi, M. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & development*, 20(22), 3084-3088.
- Connolly, E. L., Campbell, N. H., Grotz, N., Prichard, C. L., & Guerinot, M. L. (2003). Overexpression of the *FRO2* ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology*, 133(3), 1102-1110.
- Considine, M. J., Siddique, K. H. M., & Foyer, C. H. (2017). Nature's pulse power: legumes, food security and climate change. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1815-1818.
- Conte, S. S., & Walker, E. L. (2012). Genetic and biochemical approaches for studying the yellow stripe-like transporter family in plants. *Current Top Members*, 69, 295-322.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., . . . Mari, S. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of botany*, 103(1), 1-11.
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., & Klausner, R. D. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25660-25667.
- Day, D., & Copeland, L. (1991). Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29(2), 185-201.
- Dazzo, F. (1982). Leguminous root nodules.
- de Abreu-Neto, J. B., Turchetto-Zolet, A. C., de Oliveira, L. F., Zanettini, M. H., & Margis-Pinheiro, M. (2013). Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS JOURNAL*, 280(7), 1604-1616.
- De Feo, C. J., Aller, S. G., Siluvai, G. S., Blackburn, N. J., & Unger, V. M. (2009). Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(11), 4237-4242.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13(13), 4777-4788.
- Deinlein, U., Weber, M., Schmidt, H., Rensch, S., Trampczynska, A., Hansen, T. H., . . . Clemens, S. (2012). Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation. *Plant Cell*, 24(2), 708-723.

- Delaux, P. M., Bécard, G., & Combier, J. P. (2013). NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytologist*, 199(1), 59-65.
- Delgado, M. J., Tresierra-Ayala, A., Talbi, C., & Bedmar, E. J. (2006). Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* modA and modB genes involved in molybdenum transport. *Microbiology*, 152(1), 199-207.
- Delhaize, E., Gruber, B. D., Pittman, J. K., White, R. G., Leung, H., Miao, Y., . . . Richardson, A. E. (2007). A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *The Plant Journal*, 51(2), 198-210.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D. M., White, R. G., & Ryan, P. R. (2003). Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell*, 15(5), 1131-1142.
- Demeterio, J. L., Ellis, R., & Paulsen, G. M. (1972). Nodulation and nitrogen fixation by two soybean varieties as affected by phosphorus and zinc nutrition. *Agronomy Journal*, 64(5), 566-568.
- Deng, F., Yamaji, N., Xia, J., & Ma, J. F. (2013). A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant physiology*, 163(3), 1353-1362.
- Devers, E. A., Teply, J., Reinert, A., Gaude, N., & Krajinski, F. (2013). An endogenous artificial microRNA system for unraveling the function of root endosymbioses related genes in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology*, 13(1), 1.
- DiDonato, R. J., Roberts, L. A., Sanderson, T., Eisley, R. B., & Walker, E. L. (2004). *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *The Plant Journal*, 39(3), 403-414.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A., & Kim, C. H. (1987). The nifA gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3217-3223.
- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A., & Eide, D. J. (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe (II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26092-26099.
- Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology*, 24(5), R184-R190.
- Dumay, Q. C., Debut, A. J., Mansour, N. M., & Saier Jr, M. H. (2006). The copper transporter (Ctr) family of Cu⁺ uptake systems. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 11(1-2), 10-19.
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 117-128.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., & Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93(11), 5624-5628.
- Ellis, C. D., Macdiarmid, C. W., & Eide, D. J. (2005). Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28811-28818.
- Ellis, C. D., Wang, F., MacDiarmid, C. W., Clark, S., Lyons, T., & Eide, D. J. (2004). Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol*, 166(3), 325-335.
- Eren, E., & Argüello, J. M. (2004). Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting PIB-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiology*, 136(3), 3712-3723.
- Eroglu, S., Meier, B., von Wirén, N., & Peiter, E. (2016). The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in Arabidopsis. *Plant physiology*, 170(2), 1030-1045.
- Fedorova, E., Thomson, R., Whitehead, L. F., Maudoux, O., Udvardi, M. K., & Day, D. A. (1999). Localization of H⁺-ATPases in soybean root nodules. *Planta*, 209(1), 25-32.
- Finkelstein, J. (2009). Metalloproteins. *Nature*, 460(7257), 813-813.

- Flis, P., Ouerdane, L., Grillet, L., Curie, C., Mari, S., & Lobinski, R. (2016). Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection. *New Phytology*, 211(3), 1129-1141.
- Flis, P., Ouerdane, L., Grillet, L., Curie, C., Mari, S., & Lobinski, R. (2016). Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection. *New Phytologist*, 211(3), 1129-1141.
- Foster, A. W., Osman, D., & Robinson, N. J. (2014). Metal preferences and metallation. *Journal of biological chemistry*, 289(41), 28095-28103.
- Fujiwara, T., Kawachi, M., Sato, Y., Mori, H., Kutsuna, N., Hasezawa, S., & Maeshima, M. (2015). A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 282(10), 1965-1979.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., . . . Maeshima, M. (2011). iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(4), 1893-1907.
- Fukumorita, T., Noziri, Y., Haraguchi, H., & Chino, M. (1983). Inorganic content in rice phloem sap. *Soil science and plant nutrition*, 29(2), 185-192.
- Garcia-Molina, A., Andrés-Colás, N., Perea-García, A., Neumann, U., Dodani, S. C., Huijser, P., . . . Puig, S. (2013). The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), 1378-1390.
- Garcia-Molina, A., Andrés-Colás, N., Perea-García, A., del Valle-Tascón, S., Peñarrubia, L., & Puig, S. (2011). The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *The Plant Journal*, 65(6), 848-860.
- Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M., & Krajinski, F. (2012). Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal*, 69(3), 510-528.
- Geldner, N. (2013). The endodermis. *Annual review of plant biology*, 64, 531-558.
- Genre, A., & Russo, G. (2016). Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions? *Frontiers In Plant Science*, 7, 96.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gomez, S. K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E. B., . . . Harrison, M. J. (2009). *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, 9(1), 10.
- González-Guerrero, M., Azcon-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C. W., Eide, D. J., & Ferrol, N. (2005). Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetical Biology*, 42(2), 130-140.
- González-Guerrero, M., Matthiadis, A., Saez, Á., & Long, T. A. (2014). Fixating on metals: New insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- González-Guerrero, M., Escudero, V., Saéz, Á., & Tejada-Jiménez, M. (2016). Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Frontiers in plant science*, 7.
- Grignon, C., & Sentenac, H. (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual review of plant biology*, 42(1), 103-128.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L., & Eide, D. (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95(12), 7220-7224.

- Grotz, N., & Guerinot, M. L. (2006). Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 595-608.
- Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 190-198.
- Guerinot, M. L. (2016). Micronutrients: Supplementing seeds with zinc. *Nature plants*, 2, 16060.
- Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73-83.
- Gustin, J. L., Zanis, M. J., & Salt, D. E. (2011). Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evolutive Biology*, 11, 76.
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis.
- Hacisalihoglu, G., & Kochian, L. V. (2003). How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants. *New phytologist*, 159(2), 341-350.
- Hakoyama, T., Niimi, K., Yamamoto, T., Isobe, S., Sato, S., Nakamura, Y., . . . Brossuleit, K. (2012). The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 225-236.
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081-1084.
- Hallsworth, E. (1960). Copper and cobalt in nitrogen fixation. *Nature*, 187(4731), 79-80.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
- Handa, Y., Nishide, H., Takeda, N., Suzuki, Y., Kawaguchi, M., & Saito, K. (2015). RNA-seq transcriptional profiling of an arbuscular mycorrhiza provides insights into regulated and coordinated gene expression in *Lotus japonicus* and *Rhizophagus irregularis*. *Plant and Cell Physiology*, pcv071.
- Haney, C. J., Grass, G., Franke, S., & Rensing, C. (2005). New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 215-226.
- Hardy, R. W., Holsten, R., Jackson, E., & Burns, R. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology*, 43(8), 1185-1207.
- Harrison, M. J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59, 19-42.
- Harrison, M. J. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 15(6), 691-698.
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14(10), 2413-2429.
- Havlin, J. L., Beaton, J. D., Nelson, W. L., & Tisdale, S. L. (2005). *Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management* (Vol. 515): Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Haydon, M. J., & Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174(3), 499-506.
- Haydon, M. J., Kawachi, M., Wirtz, M., Hillmer, S., Hell, R., & Krämer, U. (2012). Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 724-737.
- Hazama, K., Nagata, S., Fujimori, T., Yanagisawa, S., & Yoneyama, T. (2015). Concentrations of metals and potential metal-binding compounds and speciation of Cd, Zn and Cu in phloem and xylem saps from castor bean plants

- (*Ricinus communis*) treated with four levels of cadmium. *Physiological Plantarum*, 154(2), 243-255.
- Hennecke, H., Kaluza, K., Thöny, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W., & Stackebrandt, E. (1985). Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology*, 142(4), 342-348.
- Henriques, R., Jásik, J., Klein, M., Martinoia, E., Feller, U., Schell, J., . . . Koncz, C. (2002). Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene *IRT1* results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant molecular biology*, 50(4-5), 587-597.
- Higuchi, K., Nishizawa, N., Römheld, V., Marschner, H., & Mori, S. (1996). Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant '*chloronerva*'. *Journal of plant nutrition*, 19(8-9), 1235-1239.
- Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1317-1323.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.-J., Culotta, V. C., Peñarrubia, L., & Amasino, R. M. (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 117(4), 1227-1234.
- Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., . . . Ecker, J. R. (1999). RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, 97(3), 383-393.
- Hogekamp, C., Arndt, D., Pereira, P. A., Becker, J. D., Hohnjec, N., & Küster, H. (2011). Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiology*, 157(4), 2023-2043.
- Hogekamp, C., & Küster, H. (2013). A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *BMC genomics*, 14(1), 1.
- Horváth, B., Yeun, L. H., Domonkos, Á., Halász, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., . . . Tadege, M. (2011). *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(11), 1345-1358.
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., . . . Cobbett, C. S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(5), 1327-1339.
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.
- Ibrikci, H., & Moraghan, J. T. (1993). Differential responses of soybean and dry bean to zinc deficiency 1. *Journal of plant nutrition*, 16(9), 1791-1805.
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., . . . Nishizawa, N. K. (2009). Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3470-3479.
- Irtelli, B., Petrucci, W., & Navari-Izzo, F. (2009). Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *Journal of experimental botany*, 60(1), 269-277.
- Jain, A., Wilson, G. T., & Connolly, E. L. (2014). The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *From soil to seed: micronutrient movement into and within the plant*, 106.
- Javot, H., Penmetsa, R. V., Terzaghi, N., Cook, D. R., & Harrison, M. J. (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular

- mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104(5), 1720-1725.
- Jean, M. L., Schikora, A., Mari, S., Briat, J. F., & Curie, C. (2005). A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *The Plant Journal*, 44(5), 769-782.
- Jiao, J., Wu, L. J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X. X., . . . Tian, C. F. (2016). MucR Is Required for Transcriptional Activation of Conserved Ion Transporters to Support Nitrogen Fixation of *Sinorhizobium fredii* in Soybean Nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 29(5), 352-361.
- Jung, H.-i., Gayomba, S. R., Rutzke, M. A., Craft, E., Kochian, L. V., & Vatamaniuk, O. K. (2012). COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in Arabidopsis and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33252-33267.
- Jung, H.-i., Gayomba, S. R., Yan, J., & Vatamaniuk, O. K. (2014). Brachypodium distachyon as a model system for studies of copper transport in cereal crops. *From soil to seed: micronutrient movement into and within the plant*, 180.
- Kahn, D., David, M., Domergue, O., Davenport, M., Ghai, J., Hirsch, P., & Batut, J. (1989). *Rhizobium meliloti* fixGHI sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of bacteriology*, 171(2), 929-939.
- Kaiser, B. N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., . . . Day, D. A. (2003). The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal*, 35(3), 295-304.
- Takei, Y., Ishimaru, Y., Kobayashi, T., Yamakawa, T., Nakanishi, H., & Nishizawa, N. K. (2012). OsYSL16 plays a role in the allocation of iron. *Plant Mol Biol*, 79(6), 583-594.
- Kambe, T., Suzuki, T., Nagao, M., & Yamaguchi-Iwai, Y. (2006). Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 4(1), 1-9.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babychuk, E., Inzé, D., & Van Montagu, M. (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28479-28486.
- Kang, Y., Li, M., Sinharoy, S., & Verdier, J. (2016). A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1175.
- Karunakaran, R., Ramachandran, V., Seaman, J., East, A., Mouhsine, B., Mauchline, T., . . . Poole, P. (2009). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *Journal of bacteriology*, 191(12), 4002-4014.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T., & Maeshima, M. (2008). Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8374-8383.
- Klaumann, S., Nickolaus, S. D., Fürst, S. H., Starck, S., Schneider, S., Ekkehard Neuhaus, H., & Trentmann, O. (2011). The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 192(2), 393-404.
- Klomp, A. E., Juijn, J. A., Berger, R., & Klomp, L. W. (2003). The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *Biochemical Journal*, 370(3), 881-889.
- Kobae, Y., Tomioka, R., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Ohmori, Y., Nishida, S., & Fujiwara, T. (2014). Selective induction of putative iron transporters, OPT8a and OPT8b, in maize by mycorrhizal colonization. *Soil science and plant nutrition*, 60(6), 843-847.

- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M. H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T., & Maeshima, M. (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 45(12), 1749-1758.
- Kobayashi, Y., Kuroda, K., Kimura, K., Southron-Francis, J. L., Furuzawa, A., Kimura, K., . . . Koyama, H. (2008). Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 148(2), 969-980.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., & Soulimane, T. (2015). Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function. *FEBS Lett*, 589(12), 1283-1295.
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L., & Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant molecular biology*, 40(1), 37-44.
- Krusell, L., Krause, K., Ott, T., Desbrosses, G., Krämer, U., Sato, S., . . . Sandal, N. (2005). The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *The Plant Cell*, 17(5), 1625-1636.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635.
- Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H.-J., Mendel, R. R., & Schwarz, G. (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, 430(7001), 803-806.
- Köster, J., Shi, R., Von Wiren, N., & Weber, G. (2011). Evaluation of different column types for the hydrophilic interaction chromatographic separation of iron-citrate and copper-histidine species from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4934-4943.
- Küpper, H., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., & Kroneck, P. M. (2004). Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiology*, 134(2), 748-757.
- Lee, J., Peña, M. M. O., Nose, Y., & Thiele, D. J. (2002). Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4380-4387.
- Lee, S., Chiecko, J. C., Kim, S. A., Walker, E. L., Lee, Y., Guerinot, M. L., & An, G. (2009). Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiology*, 150(2), 786-800.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C., & Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344.
- Leszczyszyn, O. I., Schmid, R., & Blindauer, C. A. (2007). Toward a property/function relationship for metallothioneins: Histidine coordination and unusual cluster composition in a zinc-metallothionein from plants. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(4), 922-935.
- LeVier, K., Day, D. A., & Guerinot, M. L. (1996). Iron uptake by symbiosomes from soybean root nodules. *Plant physiology*, 111(3), 893-900.
- Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515-29519.
- Liao, M., Hedley, M., Woolley, D., Brooks, R., & Nichols, M. (2000). Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondo) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil*, 223(1), 245-254.

- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302(5645), 630-633.
- Limpens, E., Moling, S., Hooiveld, G., Pereira, P. A., Bisseling, T., Becker, J. D., & Küster, H. (2013). Cell- and tissue-specific transcriptome analyses of *Medicago truncatula* root nodules. *PLoS One*, 8(5), e64377.
- Lin, Y. F., Liang, H. M., Yang, S. Y., Boch, A., Clemens, S., Chen, C. C., . . . Yeh, K. C. (2009). Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytologist*, 182(2), 392-404.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- López-Millán, A. F., Ellis, D. R., & Grusak, M. A. (2004). Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 54(4), 583-596.
- Lu, M., Li, Z., Liang, J., Wei, Y., Rensing, C., & Wei, G. (2016). Zinc Resistance Mechanisms of P_{1B}-type ATPases in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020. *Scientific reports*, 6, 29355.
- Lubkowitz, M. (2011). The oligopeptide transporters: a small gene family with a diverse group of substrates and functions? *Molecular plant*, 4(3), 407-415.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., & Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO journal*, 19(12), 2845-2855.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*: Academic press.
- Marsh, J. F., Rakocevic, A., Mitra, R. M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., . . . Oldroyd, G. E. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiology*, 144(1), 324-335.
- Masuda, H., Ishimaru, Y., Aung, M. S., Kobayashi, T., Kakei, Y., Takahashi, M., . . . Nishizawa, N. K. (2012). Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Scientific reports*, 2, 543.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., & Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 114-122.
- Mendel, R. R., & Bittner, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 621-635.
- Menguer, P. K., Farthing, E., Peaston, K. A., Ricachenevsky, F. K., Fett, J. P., & Williams, L. E. (2013). Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2871-2883.
- Merchant, S., & Bogorad, L. (1986). Regulation by copper of the expression of plastocyanin and cytochrome c552 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and cellular biology*, 6(2), 462-469.
- Mertz, W. (2012). *Trace elements in human and animal nutrition* (Vol. 2): Elsevier.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L. H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., . . . Cook, D. R. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium-and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8), 912-921.
- Miller, R. W., Yu, Z., & Zarkadas, C. G. (1993). The nitrogenase proteins of *Rhizobium meliloti*: purification and properties of the MoFe and Fe components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1163(1), 31-41.
- Milner, M. J., Seamon, J., Craft, E., & Kochian, L. V. (2013). Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 369-381.

- Mira, H., Martínez-García, F., & Peñarrubia, L. (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *The Plant Journal*, 25(5), 521-528.
- Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M. J., Giralt, E., . . . Pérez-Payá, E. (2004). Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein. *BMC Structural Biology*, 4, 7.
- Mira, H., Vilar, M., Pérez-Payá, E., & Peñarrubia, L. (2001). Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH). *Biochemical Journal*, 357(Pt 2), 545-549.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., & Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics*, 8(1), 1.
- Moreau, S., Day, D. A., & Puppo, A. (1998). Ferrous iron is transported across the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta*, 207(1), 83-87.
- Moreau, S., Thomson, R. M., Kaiser, B. N., Trevaskis, B., Guerinot, M. L., Udvardi, M. K., . . . Day, D. A. (2002). GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4738-4746.
- Mukherjee, I., Campbell, N. H., Ash, J. S., & Connolly, E. L. (2006). Expression profiling of the *Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO)* gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 223(6), 1178-1190.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., . . . Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(1), 34-41.
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, 51(6), 1126-1136.
- Niemietz, C. M., & Tyerman, S. D. (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS letters*, 465(2-3), 110-114.
- Nishida, S., Mizuno, T., & Obata, H. (2008). Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(5-6), 601-606.
- Nishiyama, R., Kato, M., Nagata, S., Yanagisawa, S., & Yoneyama, T. (2012). Identification of Zn-nicotianamine and Fe-2'-deoxymugineic acid in the phloem sap from rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant and cell physiology*, 53(2), 381-390.
- Nose, Y., Rees, E. M., & Thiele, D. J. (2006). Structure of the Ctr1 copper trans **'PORE' ter reveals novel architecture**. *Trends in biochemical sciences*, 31(11), 604-607.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Uozumi, N., . . . Nishizawa, N. K. (2011). Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5446-5454.
- O'Halloran, T. V., & Culotta, V. C. (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25057-25060.
- O'Hara, G. W. (2001). Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Australian Journal of Experimental Agronomy*, 41(3), 417-433.
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263.

- Oldroyd, G. E., Harrison, M. J., & Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiology*, 137(4), 1205-1210.
- Olsen, L. I., Hansen, T. H., Larue, C., Østerberg, J. T., Hoffmann, R. D., Liesche, J., ... & Grolmund, D. (2016). Mother-plant-mediated pumping of zinc into the developing seed. *Nature plants*, 2, 16036.
- Olsen, L. I., & Palmgren, M. G. (2014). Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. *Frontiers In Plant Science*, 5, 30.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., ... Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, 15(6), 531-535.
- Palmer, C. M., & Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology*, 5(5), 333-340.
- Palmiter, R. D., & Findley, S. D. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO journal*, 14(4), 639.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 1-34.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.
- Patel, S. J., Padilla-Benavides, T., Collins, J. M., & Argüello, J. M. (2014). Functional diversity of five homologous Cu⁺-ATPases present in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 160(6), 1237-1251.
- Pedas, P., Schiller Stokholm, M., Hegelund, J. N., Ladegard, A. H., Schjoerring, J. K., & Husted, S. (2014). Golgi localized barley MTP8 proteins facilitate Mn transport. *PLoS One*, 9(12), e113759.
- Pedas, P., Ytting, C. K., Fuglsang, A. T., Jahn, T. P., Schjoerring, J. K., & Husted, S. (2008). Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiology*, 148(1), 455-466.
- Perea-García, A., García-Molina, A., Andrés-Colás, N., Vera-Sirera, F., Pérez-Amador, M. A., Puig, S., & Peñarrubia, L. (2013). Arabidopsis copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiology*, 162(1), 180-194.
- Perea-García, A., Sanz, A., Moreno, J., Andrés-Bordería, A., de Andrés, S. M., Davis, A. M., ... Peñarrubia, L. (2016). Daily rhythmicity of high affinity copper transport. *Plant signaling & behavior*, 11(3), e1140291.
- Peñarrubia, L., Romero, P., Carrió-Seguí, A., Andrés-Bordería, A., Moreno, J., & Sanz, A. (2015). Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Frontiers in plant science*, 6, 255.
- Pich, A., & Scholz, G. (1996). Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 47(1), 41-47.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Gogolin, K. A., & Ye, H. (2006). Copper cofactor delivery in plant cells. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 256-263.
- Potocki, S., Valensin, D., Camponeschi, F., & Kozłowski, H. (2013). The extracellular loop of IRT1 ZIP protein--the chosen one for zinc? *J Inorg Biochem*, 127, 246-252.
- Preisig, O., Zufferey, R., & Hennecke, H. (1996). The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase. *Archives of microbiology*, 165(5), 297-305.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A., & Hennecke, H. (1996). A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 178(6), 1532-1538.

- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenón, V., Andrés-Colás, N., Garcia-Molina, A., . . . Peñarrubia, L. (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 354(2), 385-390.
- Puig, S., Rees, E. M., & Thiele, D. J. (2002). The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure*, 10(10), 1292-1295.
- Raimunda, D., González-Guerrero, M., Leeber III, B. W., & Argüello, J. M. (2011). The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals*, 24(3), 467-475.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution*, 21(3), 541-554.
- Ravet, K., & Pilon, M. (2013). Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 919-932.
- Reedy, C. J., & Gibney, B. R. (2004). Heme protein assemblies. *Chemical reviews*, 104(2), 617-650.
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J. Á., García-Alonso, J. I., . . . Álvarez-Fernández, A. (2010). Identification of a tri-iron (III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology*, 51(1), 91-102.
- Rellán-Álvarez, R., Abadía, J., & Álvarez-Fernández, A. (2008). Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(10), 1553-1562.
- Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E., & Bleeker, A. B. (1999).** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science*, 283(5404), 996-998.
- Rodriguez-Celma, J., Lin, W. D., Fu, G. M., Abadia, J., Lopez-Millan, A. F., & Schmidt, W. (2013). Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 162(3), 1473-1485.
- Rodríguez-Haas, B., Finney, L., Vogt, S., González-Melendi, P., Imperial, J., & González-Guerrero, M. (2013). Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules. *Metallomics*, 5(9), 1247-1253.
- Roschzttardtz, H., Conéjéro, G., Curie, C., & Mari, S. (2009). Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant physiology*, 151(3), 1329-1338.
- Roschzttardtz, H., Séguéla-Arnaud, M., Briat, J.-F., Vert, G., & Curie, C. (2011). The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell*, 23(7), 2725-2737.
- Rosendahl, L., Glenn, A. R., & Dilworth, M. J. (1991). Organic and inorganic inputs into legume root nodule nitrogen fixation. *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*, 259-291.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., . . . Moreau, S. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal*, 77(6), 817-837.
- Rubio, L. M., & Ludden, P. W. (2005). Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 405-414.
- Rubio, M. C., Becana, M., Sato, S., James, E. K., Tabata, S., & Spaink, H. P. (2007). Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(3), 262-275.
- Rubio, M. C., James, E. K., Clemente, M. R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C. P., & Becana, M. (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen

- peroxide in legume root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(12), 1294-1305.
- Russell, J. E. (2002). *Soil conditions and plants growth*: Daya Books. ISBN: 9781118337295
- Römheld, V., & Marschner, H. (1991). Function of micronutrients in plants. *Micronutrients in agriculture*, 297-328.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Baker, A. J., Raskin, I., & Pickering, I. J. (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 33(5), 713-717.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1)
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. J., & Peñarrubia, L. (2004). The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15348-15355.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J., & Peñarrubia, L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 51(4), 577-587.
- Santi, S., & Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist*, 183(4), 1072-1084.
- Sautron, E., Mayerhofer, H., Giustini, C., Pro, D., Crouzy, S., Ravaut, S., ... & Seigneurin-Berny, D. (2015). HMA6 and HMA8 are two chloroplast Cu+-ATPases with different enzymatic properties. *Bioscience reports*, 35(3), e00201.
- Schaaf, G., Erenoglu, B. E., & von Wirén, N. (2004). Physiological and biochemical characterization of metal-phytosiderophore transport in graminaceous species. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7), 989-995.
- Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B. E., Mori, S., Kitahara, T., & von Wirén, N. (2004). ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore-and nicotianamine-chelated metals. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9091-9096.
- Schagerlöff, U., Wilson, G., Hebert, H., Al-Karadaghi, S., & Hägerhäll, C. (2006). Transmembrane topology of FRO2, a ferric chelate reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 62(1-2), 215-221.
- Schikora, A., Thimm, O., Linke, B., Buckhout, T. J., Müller, M., & Schmidt, W. (2006). Expression, localization, and regulation of the iron transporter LeIRT1 in tomato roots. *Plant and soil*, 284(1), 101-108.
- Schiestl, R. H., & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics*, 16(5-6), 339-346.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.
- Schmid, N. B., Giehl, R. F., Doll, S., Mock, H. P., Strehmel, N., Scheel, D., . . . von Wirén, N. (2014). Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 164(1), 160-172.
- Schmitz, A. M., & Harrison, M. J. (2014). Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of integrative plant biology*, 56(3), 250-261.
- Schwarz, G., Mendel, R. R., & Ribbe, M. W. (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 460(7257), 839-847.
- Seliga, H. (1993). The role of copper in nitrogen fixation in *Lupinus luteus* L. In *Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice* (pp. 459-462): Springer.
- Shanmugam, V., Lo, J. C., Wu, C. L., Wang, S. L., Lai, C. C., Connolly, E. L., . . . Yeh, K. C. (2011). Differential expression and regulation of iron-regulated metal

- transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*—the role in zinc tolerance. *New Phytologist*, 190(1), 125-137.
- Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. (1981). *Methods in yeast genetics: laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York.
- Shikanai, T., Müller-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K. K., & Pilon, M. (2003). PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *The Plant Cell*, 15(6), 1333-1346.
- Shukla, U., & Yadav, O. (1982). Effect of phosphorus and zinc on nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil*, 65(2), 239-248.
- Sinclair, S. A., & Krämer, U. (2012). The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(9), 1553-1567.
- Singh, A., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). The role of organic vs. inorganic fertilizers in reducing phytoavailability of heavy metals in a wastewater-irrigated area. *Ecological engineering*, 36(12), 1733-1740.
- Siso-Terraza, P., Luis-Villarroya, A., Fourcroy, P., Briat, J. F., Abadia, A., Gaymard, F., . . . Alvarez-Fernandez, A. (2016). Accumulation and Secretion of Coumarinolignans and other Coumarins in *Arabidopsis thaliana* Roots in Response to Iron Deficiency at High pH. *Frontiers In Plant Science*, 7, 1711.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., & Bisseling, T. (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant physiology*, 145(1), 183-191.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308(5729), 1789-1791.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology*, 62, 227-250.
- Snowball, K., Robson, A., & Loneragan, J. (1980). The effect of copper on nitrogen fixation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). *New Phytologist*, 85(1), 63-72.
- Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S. K., & Palmer, A. E. (2001). Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(24), 4570-4590.
- Solé, V., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., & Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(1), 63-68.
- Sommer, A. (2001). *Vitamin A deficiency*: Wiley Online Library.
- Song, W.-Y., Choi, K. S., Geisler, M., Park, J., Vincenzetti, V., Schellenberg, M., . . . Lee, Y. (2010). *Arabidopsis* PCR2 is a zinc exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport. *The Plant Cell*, 22(7), 2237-2252.
- Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., & Batut, J. (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92(9), 3759-3763.
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2007). The carboxylate shift in zinc enzymes: A computational study. *Journal of the American Chemical Society*, 129(5), 1378-1385.
- Steudle, E., & Peterson, C. A. (1998). How does water get through roots? *Journal of experimental Botany*, 49(322), 775-788.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J.-K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.

- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., & Nelson, N. (1996). A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93(10), 5105-5110.
- Sutton, M. A., Howard, C. M., Erisman, J. W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., . . . Grizzetti, B. (2011). *The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives*: Cambridge University Press.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., . . . Chabaud, M. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 54(2), 335-347.
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 306(5940), 284-287.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). Fisiologia vegetal. In *Fisiologia vegetal*: Artmed.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell*, 15(6), 1263-1280.
- Takanashi, K., Yokosho, K., Saeki, K., Sugiyama, A., Sato, S., Tabata, S., . . . Yazaki, K. (2013). LjMATE1: a citrate transporter responsible for iron supply to the nodule infection zone of *Lotus japonicus*. *Plant and cell physiology*, 54(4), 585-594.
- Tamayo, E., Gómez-Gallego, T., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2014). Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in plant science*, 5, 547.
- Tanaka, N., Fujiwara, T., Tomioka, R., Krämer, U., Kawachi, M., & Maeshima, M. (2015). Characterization of the Histidine-Rich Loop of Arabidopsis Vacuolar Membrane Zinc Transporter AtMTP1 as a Sensor of Zinc Level in the Cytosol. *Plant and Cell Physiology*, 56(3), 510-519.
- Tanaka, N., Kawachi, M., Fujiwara, T., & Maeshima, M. (2013). Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane zinc transporter MTP1. *FEBS open bio*, 3(1), 218-224.
- Tang, C., Robson, A. D., & Dilworth, M. J. (1990). The role of iron in nodulation and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L. *New Phytologist*, 114(2), 173-182.
- Tapken, W., Ravet, K., & Pilon, M. (2012). Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18544-18550.
- Tapken, W., Ravet, K., Shahbaz, M., & Pilon, M. (2015). Regulation of Cu delivery to chloroplast proteins. *Plant signaling & behavior*, 10(7), e1046666.
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S., & Cobbett, C. S. (2010). Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics*, 2(8), 556-564.
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Lucas, M. M., Udvardi, M., Imperial, J., & González-Guerrero, M. (2015). *Medicago truncatula* Natural Resistance-Associated Macrophage Protein1 is required for iron uptake by rhizobia-infected nodule cells. *Plant Physiology*, 168, 258-272.
- Tejima, K., Arima, Y., Yokoyama, T., & Sekimoto, H. (2003). Composition of amino acids, organic acids, and sugars in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Soil science and plant nutrition*, 49(2), 239-247.
- Terry, R., Soerensen, K., Von Jolley, D., & Brown, J. (1991). The role of active *Bradyrhizobium japonicum* in iron stress response of soybeans. *Iron Nutrition and Interactions in Plants* (pp. 265-270): Springer.
- Terzano, R., Al Chami, Z., Vekemans, B., Janssens, K., Miano, T., & Ruggiero, P. (2008). Zinc distribution and speciation within rocket plants (*Eruca vesicaria* L. Cavaleri) grown on a polluted soil amended with compost as determined by XRF microtomography and micro-XANES. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 56(9), 3222-3231.

- Thomine, S., & Vert, G. (2013). Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current opinion in plant biology*, 16(3), 322-327.
- Tramczynska, A., Küpper, H., Meyer-Klaucke, W., Schmidt, H., & Clemens, S. (2010). Nicotianamine forms complexes with Zn (II) in vivo. *Metallomics*, 2(1), 57-66.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., . . . Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269(5227), 1069-1074.
- Tyerman, S. D., Whitehead, L. F., & Day, D. A. (1995). A channel-like transporter for NH₄⁺ on the symbiotic interface of N₂-fixing plants. *Nature*, 378(6557), 629.
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual review of plant biology*, 64, 781-805.
- Udvardi, M. K., & Day, D. A. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual review of plant biology*, 48(1), 493-523.
- Vahling-Armstrong, C. M., Zhou, H., Benyon, L., Morgan, J. K., & Duan, Y. (2012). Two plant bacteria, *S. meliloti* and *Ca. Liberibacter asiaticus*, share functional *znuABC* homologues that encode for a high affinity zinc uptake system. *PLoS one*, 7(5), e37340.
- Vallee, B. L., & Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29(24), 5647-5659.
- Vance, C. P., & Ganttt, J. S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 266-274.
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., & Leister, D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 31(5), 589-599.
- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S., & Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4295-4306.
- Vernoud, V., Journet, E.-P., & Barker, D. G. (1999). MtENOD20, a Nod factor-inducible molecular marker for root cortical cell activation. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(7), 604-614.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., . . . Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS letters*, 576(3), 306-312.
- Vest, K. E., Wang, J., Gammon, M. G., Maynard, M. K., White, O. L., Cobine, J. A., . . . Cobine, P. A. (2016). Overlap of copper and iron uptake systems in mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Open biology*, 6(1), 150223.
- Vicente, E. J., & Dean, D. R. (2017). Keeping the nitrogen-fixation dream alive. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114(12), 3009-3011.
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications. pp.164
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato Bushy Stunt Virus*. *The Plant Journal*, 33(5), 949-956.
- von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.-F., Khodr, H., Shioiri, T., . . . Hider, R. C. (1999). Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, 119(3), 1107-1114.
- von Wirén, N., Mori, S., Marschner, H., & Romheld, V. (1994). Iron inefficiency in maize mutant ys1 (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiology*, 106(1), 71-77.
- Waters, B. M., Chu, H.-H., DiDonato, R. J., Roberts, L. A., Easley, R. B., Lahner, B., . . . Walker, E. L. (2006). Mutations in *Arabidopsis yellow stripe-like1* and *yellow stripe-like3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiology*, 141(4), 1446-1458.
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F., & Leister, D. (2003). Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron

- flow in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31286-31289.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1), 49-84.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 104-126.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y. Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H. S., . . . Vulpe, C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47644-47653.
- Wintz, H., & Vulpe, C. (2002). Plant copper chaperones. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 732-735.
- Wirth, J., Poletti, S., Aeschlimann, B., Yakandawala, N., Drosse, B., Osorio, S., . . . Gruissem, W. (2009). Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. *Plant Biotechnology Journal*, 7(7), 631-644.
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Agrobacterium protocols*, 43-54.
- Wittenberg, J. B. (1974). Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4057-4066.
- Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Day, D. A., Udvardi, M. K., & Appleby, C. A. (1996). Siderophore-bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Plant and soil*, 178(2), 161-169.
- Wu, Y. H., & Eide, D. J. (2016). Zinc Transporters and Trafficking in Yeast. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., . . . Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development*, 141(18), 3517-3528.
- Yan, N. (2015). Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annual review of biophysics*, 44, 257-283.
- Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, 5(9), 1090-1109.
- Yuan, M., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2011). Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC plant biology*, 11(1), 69.
- Zeng, L., Miller, E. W., Pralle, A., Isacoff, E. Y., & Chang, C. J. (2006). A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 10-11.
- Zhang, H., Yang, J., Wang, W., Li, D., Hu, X., Wang, H., . . . Li, C. (2015). Genome-wide identification and expression profiling of the copper transporter gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 451-460.
- Zhang, M.-Y., Bourbonloux, A., Cagnac, O., Srikanth, C. V., Rentsch, D., Bachhawat, A. K., & Delrot, S. (2004). A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Physiology*, 134(1), 482-491.
- Zhao, H., & Eide, D. (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(6), 2454-2458.
- Zhao, H., & Eide, D. (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23203-23210.
- Zheng, L., Yamaji, N., Yokosho, K., & Ma, J. F. (2012). YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *The Plant Cell*, 24(9), 3767-3782.

- Zielazinski, E. L., González-Guerrero, M., Subramanian, P., Stemmler, T. L., Argüello, J. M., & Rosenzweig, A. C. (2013). *Sinorhizobium meliloti* Nia is a P_{1B}-5-ATPase expressed in the nodule during plant symbiosis and is involved in Ni and Fe transport. *Metallomics*, 5(12), 1614-1623.
- Zimmermann, M. H., & Milburn, J. A. (2012). *Transport in Plants I: Phloem Transport* (Vol. 1): Springer Science & Business Media.
- Zschiesche, W., Barth, O., Daniel, K., Böhme, S., Rausche, J., & Humbeck, K. (2015). The zinc-binding nuclear protein HIPP3 acts as an upstream regulator of the salicylate-dependent plant immunity pathway and of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 207(4), 1084-1096.

ANEXOS

Anexo I : Oligonucleótidos usados durante esta tesis

Propósito	Uso	Nombre	Secuencia
Genotipado de mutantes intercionales Tnt1	Específico del transposón	Tnt1-F	GACAGTGCTACCTCTCTGGATG
	Específico del transposón	Tnt1-R	CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG
	Específico del gen <i>Medtr4g019870</i>	19829-F	ACCCTCAAGCTACTATCTCTCACTCCCA
	Específico del gen <i>Medtr4g019870</i>	19829-R	AGGATTACATGAACTGCACCTGATGC
	Específico del gen <i>Medtr4g064893</i>	11171-F	AATGTCTCAATTGCGTCTTC
	Específico del gen <i>Medtr4g064893</i>	11171-R	GATTATACCCGAAAGATTGATG
	Específico del gen <i>Medtr4g064893</i>	9782-F	AAGGACAAAATACGGCGATGCCGA
	Específico del gen <i>Medtr4g064893</i>	9782-R	CCAAATGTGGCAATTGCAAACATGAGCT
PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	<i>M. truncatula ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>	MtUb v4qF	ATTCTTCACATGCGGCGATTAC
		MtUb v4qR	TTTCTCATTGCTTTTGGTGTGG
	<i>M. truncatula MtPT4 Medtr1g028600</i>	qMtPT4 Fw	GACACGAGGCGCTTTCATAGCAGC
		qMtPT4 Rv	GTCATCGCAGCTGGAACAGCACCG
	<i>Sinorhizobium meliloti SMc01032</i>	pdhB qF	GCTCTCCAAGTGGCTGAAGA
		pdhB qR	CTACCGCTTCCACTTCCATC
	<i>M. truncatula MtCOPT1 Medtr4g019870</i>	COPT1qF	AGATGATTCATATGATGAAGGAGGAC
		COPT1qR	GCAAGGAAAAACACAAAAGATAGAGC
	<i>M. truncatula COPT2 Medtr7g066070</i>	COPT2 qF	GCCTATGTCCAATGGCACAATG
		COPT2qR	GCTAAGATGTACATTCCAAGGC
	<i>M. truncatula COPT3 Medtr3g105330</i>	COPT3qF	CCTCTTCTACGACGGACGTTT
		COPT3qR	CACACCACCGTTATACGACAT
	<i>M. truncatula COPT4 Medtr4g064963</i>	COPT4qF	TGGAAGGAATGACCATGCCAC
		COPT4qR	AGAGAATTAAAGCGTCTTTGCC
	<i>M. truncatula COPT5 Medtr4g065660</i>	COPT5qF	GGATCATGGAATGGCAATGGC
		COPT5qR	GCCAGTTATCAAAGAGAATCAATGC
	<i>M. truncatula COPT6 Medtr1g015000</i>	COPT6qF	TGGTGTGAATTCGGCTATCGG
		COPT6qR	AACAACAACCGCAGCCTCTT
	<i>M. truncatula COPT7 Medtr4g065123</i>	COPT7qF	ATGGATGAGATGTCAATGGCAC
		COPT7qR	ACTTACTGGTATTACCCGCAGG
	<i>M. truncatula COPT8 Medtr0027s0220</i>	COPT8qF	GTAAAGTCAAACCTGGGACATCA
		COPT8qR	CAATAACATGGCCACCAATTGC
	<i>M. truncatula MTP2 Medtr4g064893</i>	MTP2qF	CGCCTATCTCAGATGCAAGATCAAT
		MTP2qR	GAAGCCCACACTGCAAATAGAGAGA
		CDFqR1079	GCCAGTTTCAGCCACTACAT

	<i>M. truncatula MTP2 Medtr4g064893</i>	CDFqF950	TGGAGAGAACGCCAAGTGAG
	<i>M. truncatula MtZIP6 Medtr4g083570</i>	MtZIP6 qF	CGTACGAGATGTTGTGGAGTGATTG
		MtZIP6 qR	CTCGGAATCACAACTCCGCTCTTA
	<i>M. truncatula ZIP5 Medtr1g016120</i>	5MtZIP7 271qF	CACATGCTTCAAGACGCGTGGA
		3Mt ZIP7 443qR	ACAACCTCGTCCGTGCCTGTCA
	<i>M. truncatula ZIP11 Medtr3g104400</i>	5MtZIP8 312qF	GCGATGATGGCGGCGTTGTT
		3MtZIP8 502qR	CCTATGATGCGCCGCGTGTG
	<i>M. truncatula ZIP14 Medtr6g007687</i>	MtZIP9 724qF	GGCTGCATTTCTCAGGCACA
		MtZIP9 876qR	AAATCCTTCAACTATTAGTGACTTTGG
	<i>M. truncatula ZIP16 Medtr8g105030</i>	ZIP16 qR	GGCTTTTGCCTCCGGTGTTA
		ZIP16 qF	TTTTTCCAAGGCCGTTCAGG
	<i>S. meliloti FixN1 COX subunit I SMa1220</i>	FixN1-573Fw	ACAATCGTCTGGGTTGCCTA
		FixN1-802Rv	CGTGAGAAAGAAGCCCACTG
	<i>S. meliloti FixN2 COX subunit I SMa0765</i>	FixN2qF588	CGCTTATCTGGCCGTCTTCCTC
		FixN2qR738	GGAACCCATGAACGATACCGGC
Clonaje de secuencias promotoras	<i>Clonaje promotor de Medtr4g019870 en pGWB3</i>	5MtCOPT1pGW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
		3MtCOPT1pGW	TCATTGTGTTTATATTTATAG
	<i>Clonaje promotor de Medtr7g066070 en pGWB4</i>	5MtCOPT2p - 1997GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
		3MtCOPT2p- 66GW	TATCTCACTCCCACTGAACCA
	<i>Clonaje promotor Medtr4g064893 en pGWB3</i>	5MtCDFpGW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
		3MtCDFpGW	TTTCTGAAAGAATCCCTATAC
	<i>Clonaje promotor de Medtr4g083570 en pGWB3</i>	5'ZIP6p GW	GGGGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
		3ZIP6p GW	TAACCACGGTTAAACCGTGGC
Clonaje de secuencias promotoras + gen completo (intrones + exones)		COPT1pGWB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
		COPT1pGWB1 Rv	TTAGTTGACCACATGTCAGGA
	<i>Clonaje promotor + gen completo + 3xHA en N terminal de Medtr4g019870 en pGWB1/ pGWB4</i>	3COPT1p-1+HA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
		5COPT1p+HA1	TAATGATGAACCTCGATCCCAT
		3HA123+COPT1 1FULL	GTATGGGTAAAAGATGTTAATTAACCCCA
		5HA+COPT1FUL L1	TTGGTTCACTGGGAGTGAGA
	<i>Clonaje promotor + gen completo de Medtr7g066070 en pGWB4</i>	5MtCOPT2p - 1997GW	AAGCTACTATCTCTCACTCCCACTGAACC
		3MtCOPT2full +412	AATGGGGTTAATTAACATCTTTTA
	<i>Clonaje promotor + gen completo de Medtr4g064893 en pGWB13</i>	5MtCDFpGW	GTCTGCACTGAGCAGCGT
		3MtCDFfullIGW	GACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCA
	<i>Clonaje promotor + gen completo de Medtr4g083570 en pGWB13</i>	5'ZIP6p GW	GCAATGAAGATGATTCATATGATGAA
		3' GW Mt ZIP6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
			TGACGTTGAAGTATTGATTGACACCA
Clonaje de la secuencia codificante	<i>Clonaje cDNA Medtr4g019870 en pGWB5</i>	5MtCTR1-GW C-GFP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
		3MtCTR1-GW C-GFP	TAAATGTCATCAATAGTCATGGC
			TAAATGTCATCAATAGTCATGGC
			TAAATGTCATCAATAGTCATGGC

<i>para agroinfiltración</i>	<i>Clonaje cDNA Medtr4g019870 en pGWB6</i>	5MtCTR1-GW N- GFP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGAAGATGATTCATATGATGAA
		3MtCTR1-GW N- GFP	GGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCTAAATGTCATCAATAGTCATG
	<i>Clonaje cDNA de Medtr7g066070 en pGWB5</i>	5MtCTR2GW cGFP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TATGGGCATGCCTATGGCT
		3MtCTR2GW CGFP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TAAATCTTAAGTGTAGCCGAGTCG
	<i>Clonaje cDNA de Medtr7g066070 en pGWB6</i>	5MtCTR2GW NGFP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGGGCATGCCTATGGCT
		3MtCTR2GW NGFP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TTCAAATCTTAAGTGTAGCCGAGT
<i>Clonaje de secuencias codificantes para ensayos de transporte de metales en S. cerevisae</i>	<i>Clonaje cDNA de Medtr4g064893 en pGWB5</i>	5MtMTP2+1 GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGAAGCAAATGGAACACGAG
		3' GW Mt CDF1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TACTCA ATTTGTGTATTGACA
	<i>Clonaje cDNA de Medtr4g064893 en pGWB6</i>	5MtMTP2+1 GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGAAGCAAATGGAACACGAG
		3MtMTP2+2140 GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TA TTAATCAATTTGTATGTTTAC
	<i>Clonaje del cDNA de Medtr4g083570 en pGWB5</i>	5 MtZIP6 1GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TATGGCTTATTCAGTAACTAT
		3MtZIP6+1053 GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TATTAAGCCCATTTAGCCATGAG
	<i>Clonaje cDNA Medtr4g019870 en S. cerevisae</i>	5MtCOPT1-XbaI	AATCTAGAATGAAGATGATTCATATGATG
		3MtCOPT1- EcoRI	CTAAATGTCATCAATAGTCAGAATTGTT
	<i>Clonaje cDNA Medtr7g066070 en S. cerevisae</i>	5MtPstICOPT2	TTTTCTGCAGATGGGCATGCCTATGGCT
		3MtXhoICOPT2	TTTTCTCGAGTCAAATCTTAAGTGTAGCG AGT
	<i>Clonaje cDNA Medtr4g064893 en S. cerevisae</i>	5MTP2Pst1pDR1 96	TTTTTCTGCAGATGAAGCAAATGGAACAC GAG
		3MTP2Xho1pDR 196	TTTTTCTCGAGTTACTCAATTTGTATGGT TACATGTTG
		5MtZIP6CDS- HomRecpDR196	CACATTCAAAAAGAAAGAAAAAATATAC CCCAGCCTCGAATGGCTTATTCAGTAACT ATAC
	<i>Clonaje cDNA/ cDNA + epitopo 3xHA Medtr4g083570 en S. cerevisae</i>	3MtZIP6CDS- STOP- HomRecpDR196	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCG AATTGGGTACCGTTAAGCCCATTTAGCC ATGAG
		5MtZIP6CDS- exonfinal856	GTCCAGTAGCACTAATCACCG
		3MtZIP6CDS- exonfinal1036	TGAGAGACATTCCACCAGCAC
		3MtZIPHA- STOP- HomRecpDR196	AGATTACGCTGCTCAGTGCAGCTAACGG TACCCAATTGCGCCTATAGTGAGTCGTAT TACGCGCG
<i>Creación de líneas de RNA de interferencia</i>	<i>Clonaje de las 469 primeras pb de Medtr4g083570 en pFRN</i>	5 MtZIP6 1GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TATGGCTTATTCAGTAACTAT
		3 MtZIP6 573GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TGAATCACAACTCCGCTCTTA

Anexo II : Controles de Confocal

1

Anexo II-1: Controles de localización de MtCOPT1. Sección de un nódulo de plantas de *M. truncatula* transformadas con MtCOPT1 fusionado a HA, bajo el control de su propio promotor, e inoculadas con *S. meliloti* expresando constitutivamente GFP (verde, panel superior derecho). El ADN se tiñó con DAPI (azul, panel superior izquierdo). La muestra de MtCOPT1-HA se incubó sin anticuerpo primario antiHA, pero con anticuerpo marcado con Alexa594 (panel inferior izquierdo). Estas imágenes se superpusieron junto con la imagen del nódulo bajo transiluminación (panel inferior derecho). Barra de escala = 100 μ m.

Anexo II-2: Controles de localización de MtCOPT1. Localización de la proteína de membrana plasmática AtPIP2 marcado con CFP (cián, paneles de la izquierda), de MtCOPT1 fusionado a GFP (verde, paneles centrales), y su superposición (paneles derechos) en hojas de N. benthamiana. Las imágenes de la fila superior corresponden al control negativo de MtCOPT1-GFP. Las imágenes de la fila inferior corresponden al control negativo de AtPIP2-CFP. Las imágenes se superpusieron junto con otra imagen en transiluminación. Barra de escala = 25 μ m.

Anexo III: Comparativa del promotor de MtCOPT2 para R108 y A17

A17	aaaagcaggctggagctatagcttcacatgctttttctttttattttattttattttttt
R108	-----
A17	tataatagataaaacgcagcagcagaatattgaacttttacaatgtggttcatgcttgag
R108	-----
A17	tcccgcaaagtcatttgcagcttttgatgtgaacaaattattgaggatgactgagtttta
R108	-----
A17	tcaaaataattttatagatgtgccgaaagtgcgttacacactcaacttaagagttatgt
R108	-----
A17	tatagatgtttgtgaaggtgagaaaaacacaagaaggggggggttgaattgtgttttctt
R108	-----
A17	tttctgtctaaaaaaattcttcttctgataaaactTCAGAAGCAGTTTGAGAGTGCTtct
R108	-----
A17	gatgaaatgatcagaatcagatatgcagcggaaagaacagagcagagaaaagaaagacaa
R108	-----
A17	agacacaagcagttatccttggttccttcacaacacggaagtagtccagtcccccttgca
R108	-----
A17	cttccaaggagatttcaactataatcacaagattacaactgctcaatactttctaagtatg
R108	-----
A17	agacttcacaaaactatgctcaagcacacacgcaagagtcttccaatgctcaagcactaa
R108	-----
A17	gcaagagacttctaatactcaagcacgcaggcaagagacttctaatacaaaaaataca
R108	-----
A17	gagaattgagtttgaattgaacacttgatatacaatcagtgggtgttcacaatacaataca
R108	-----
A17	gaaaagactctagactatgaatttctaagatgtatcaaatacgtgcagaaattcagtgtg
R108	-----
A17	ctttgtagtatcaaattgacagagttttggcgcttttgatttatgtatatctctgtttt
R108	-----
A17	atcttcaagtcttcaactcctttatatagaggcgtgaaagagacgttgagataatcagcac
R108	-----
A17	gtctaaagagtcgtttgaaatcctttgattatccaccagtgtatcctttgcctgatttggg
R108	-----
A17	tgtagtcctttgaagaataaaacttcaaattcattcccatcttgagttgtacaaattctgc
R108	-----
A17	aggcatggctgttggtttgtctttagcgtagacagaaaaacagagtagtggaggtagtgg
R108	-----CT--CTACATACCACATTCTT-----GG
	* * * * *
A17	ttgtacacttgactttgtcaactctatt-----aatgagagacaagtgtcagtggtta
R108	CTGTGCATATAGAATTTTGAATTCTGGGTTTTTCCATCAGGAGAAATGATTATTCTTC
	*** ** * * * * * * * *
A17	tccatatatccggttgatacctccctttcagttcttcgttcttctttgataagactgaatt

R108 ACT--TCTTTTATTAATAAATATTTTTCAGGT-----T
* * * * * * * * * *
A17 gagaatcagcaactttgaatctt-cagtttgattaaaggatcaaagttagcttctggtga
R108 AAGGGTGTGCACACTTAGAACTTCCACATTGGAAAAAGGGTCAAACAAGTATCTTGAGGA
* * * * * * * * * * * * * * *
A17 aaatattgcttctg-----atgaaaacttttgcttctga-----tgaaaat
R108 ACATTGTGCTAAGTAATGGGTAGCAGTTAGGGTCACATTTGGTCACGGGCGAATCCAAGT
*
A17 attgcttctgatgactttctgcttctgatgacgtcatctcttcaggagcagtttagcttc
R108 TGGGGCAATGtgagctatagcttcacatgcttttttcttttattttatttttt
*
A17 aggagcagtttagcttcaggagcagttttcttcagatgctcagaattttcttttctttcc
R108 tataatagataaaacgcagcagcagaatgttgaacttt----tacattgtgtttcatgct
*
A17 attgttcttccaagacctattgaaataacttgagtagcctttggtcctgtacacttgaac
R108 tgagtcctgcaaagt-----catttgcaacttttgatgtgaac
*
A17 -aattattagtaataaccaattgacaatttttaataccttggtatcatcaaaacttaata
R108 aagttattgatgatgactgagtttatcaaaataattttatagatgtgccgaaagtggcg
*
A17 aggtttattgtgaaaacacattttgttccaacagtttgatctcacccaaattttgctaag
R108 ttgcgcactcaacttaagagttatgttacagatgtttgatctgacccaaattttgctaag
*
A17 ttgaaaggctttctgatctttgtgcaaaacttgaggaaacaaataagtgaacacatttg
R108 ttgaaaggctttcgatctttgtgcaaaatttgaggaaacaaataagtgaacacatttg
*
A17 ctatgggtttataaacttttgaagttagctttgctcttgccggtagcaactgcaagtgttg
R108 ttatgggtttataaacttttgaagttggctttgctcttgctcggtagcaaccgcaagtgttg
*
A17 aacg-----tgtgaagagtaacctatgtaacaaaatggatgatgagcgcttaa
R108 aacgtgttttttcagtttgtgaagagtaacctatgtaacaaaatggatgatcagtgcttaa
*
A17 atgatgtcatttttagctcattttcaacaaatggatataagacgattttcattgtaatgca
R108 atgatgtcatttttagctcattttcaacaaatggatataagacgattttcattgtaatgta
*
A17 ttgtatcaaacaatattatttcttatttttaatatagtttgaattattgtttctttcaaa
R108 ttgtatcaaacaatattatttcttatttttaatatagtttgcattattgtttcttttaaaa
*
A17 ttttaggtccacatgtacctaagctctggatcctccctgcattgggttgccaatgtcat
R108 ttttaggtccacatgtatctaagctcggatcctccctgcattgggttgccaatgtcat
*
A17 gtgacatttgtaactacaatgtcacaaatcattttgtacacttgtagcattgtggttgga
R108 gtgacatttagcaactataatatcatatcatagtcatt-----
*
A17 taatatcgtcattggcactcaatgtcactcaagtattttacccaagtaaacacttcagaat
R108 -----ttgtacacttgtagcaattttacccaagtaaacacttcagaat
*
A17 tcagattgggttaagatgaaccatccaacagaagctccacatacaccttgaggattttca
R108 tcagattgggttaagatgaaccatccaacagaagctccacatacaccttgaggattttca
*
A17 ggaaatttacttttggtccttaacgtccctaaaaataaaaacattcatatgcaaatagaaaa
R108 ggaaatttacttttggtccttaacgtccctaaaaataaaaacattcatatgcaaatagaaaa
*
A17 tagatcggaaatatgagctcttgaacaaatttatgtatggtcctgaatgtctcccaaagc
R108 tagatcggaaatatgagctcttgaacaaatttatga-----atgtctcccaaagc
*
A17 ctctacctggtggataagatcaaagagccattttgcaacaataatgaccaaagtatatt
R108 ctctacctggtggataagatcaaagagccattttgcaacaataatgaccaaagtatatt
*
A17 tatataacgggtcttattaaggagtgccccgagacactccttaaacatttcctaataaaaa
R108 -----aacgagtccttgtaaggagtgccccgaggcaatccttaaacatttcctaataaaaa

```

          ****  *****  *****  *****  **  *****  *****  ****

A17      aaaaaattgataaaaaaaattaaaagcttcaattttataatgcaataaatgcacaaagaag
R108     aa-ttattgtttaaaaaaaattaaaaacttcaatttccaatgcaataaatgcagaaagaag
          **      ****  *  *****  *****  *****  *****  *****

A17      ctcatlgacttaaaacttctagaaaactttacatcaatattgtttactttacgatataatca
R108     ctcatlgacttaaaacttctagaaaactttacatcaatattgtttactttacgatataatca
          *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

A17      agattttactaagcaataatttgataaattagtcattattacaccctaagaata-----
R108     agattttactaagcaataatttgataaattagtcattattacaccctaagggtgcggttg
          *****  *****  *****  *****  *****  *****  *

A17      -----
R108     atttgttaaaaaatgaaggacaggacagaacaactctagttgtccagtgtttgatttgta

A17      -----
R108     aaactgtttcaggtacaggacaagctagaggcaaggacagaacaaaaactcatatTTTT

A17      -----
R108     gtcccttaccaaaccacagcacaactTTTTgtcccacgtacaagttgtctaaaataccaa

A17      -----
R108     aatagcattttgtccctcaaaaatcgtataaaacaaagaaattactcaatgccataaaaa

A17      -----
R108     atttgtcatgtgctgttctgctttgtgttgactgttctatcttgactgttctgtccag

A17      -----
R108     tacttgctgttttgcaaaccaaacacaccctaagaattTTTTtttttattccaaagtttatt
          *****  *****

A17      caactatgtaacaacttccaatctttaaaacatactgaccgtaattcccccataaccgac
R108     caactatgtaacatcttccaatctttaaaacatactgaccgtaactcccccataaacgac
          *****  *****  *****  *****  *****  *****

A17      aacaagcaaaaaacaaaatagtcacagagacatccttaaaaaataacagctaagaagtttacg
R108     aacaagcaaaaaacaaaatagtcacagcaacatccttaaaaaataacagctatgaagtttatg
          *****  *****  *****  *****  *****  *

A17      taacacatttttttaatttttatcatcattagacattggttcctcatttcattataaaaagt
R108     taacacatttttttatttttatcatcattagacattggttcctcatttcattataaaaagt
          *****  *****  *****  *****  *****  *****

A17      ttagtccaacaagaaattaaatcgttgcaatctcaaatcaatctctcaacaagaaattac
R108     ttagtccaacaagaaattaaatcgttgcaatctcaaatcaaca-----
          *****

A17      tatcattctttgtagttattatgggcATGCCTATGGCTCCAGGACAAAGCATGCCTATGT
R108     -----tgctacagacATGCCTATGGCTCCAGGACAAAACATGCCTATGT
          *      **      *  *****  *****  *****  *****

A17      CCAATGGCaCAACCAACATGATAATGAACATGCAAATGAGTTTCTTTTGGGGCAAAAATG
R108     CCAATGGCACAACCAACATGATAATGAACATGCAAATGAGTTTCTTTTGGGGCAAAAATG
          *****

A17      CCATAGTGCTTTTCTCAGGGTGGCCAAATAACAGCCTTGGAATGTACATCTTAGCTATTT
R108     CCATAGTGCTTTTCTCAGGGTGGCCAAATAACAGCCTTGGAATGTACATCTTAGCTATTT
          *****

A17      TGTTTGTGTTTATTCTAGCTTTGGCTGCCGAGGTTTTGTGCGAACCAACCATCGATCAAAC
R108     TGTTTGTGTTTATTCTAGCTTTGGCTGCCGAGGTTTTGTGCGAACCAACCATCGATCAAAC
          *****

A17      GTGGGACTAATCCACTCAAGGGAGGATTGATTTCAGTCTGGTGTTTACTTCTTTCGTATCG
R108     GTGGGACTAATCCACTCAAGGGAGGATTGATTTCAGTCTGGTGTTTACTTCTTTCGTATCG
          *****

A17      GTTTCATTTACTTGCTTATGCTTGCTGTTATGTCCTTTCATGTTGGAATCTTTATAGCTG
R108     GTTTCATTTACTTGCTTATGCTTGCTGTTATGTCCTTTCATGTTGGAATCTTTATAGCTG
          *****

```

```
A17      CTGTTCTTGATCATTGATGTTCTTGTGCGAGATCGCGTGCTATTGCTGTTGCAA
R108     CTGTTCTTGATCATTGATGTTCTTGTGCGAGATCGCGTGCTATTGCTGTTGCAA
          *****
A17      ATGGGGAAGATCAACGATCCGACTCAGCTACACTTAAGATTTGA
R108     ATGGGGAAGATCAACGATCCGACTCAGCTACACTTAAGATTTGA
          *****
```