UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas**

Departamento de Biotecnología

**Papel de MtNramp1, MtYSL1 y MtYSL8
en la homeostasis de metales en el nódulo
de *Medicago truncatula***

TESIS DOCTORAL

María del Rosario Castro Rodríguez

Licenciada en Biología

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y
de Biosistemas

Departamento de Biotecnología

Papel de MtNramp1, MtYSL1 y MtYSL8 en la homeostasis de metales en el nódulo de *Medicago truncatula*

TESIS DOCTORAL

María del Rosario Castro Rodríguez

Licenciada en Biología

Madrid, 2017

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

Departamento de Biotecnología
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Tesis Doctoral:

**“Papel de MtNramp1, MtYSL1, MtYSL8
en la homeostasis de metales en el nódulo
de *Medicago truncatula*”**

Autor:

María del Rosario Castro Rodríguez

Licenciada en Biología

Director:

Manuel González Guerrero

Licenciado en Bioquímica

Doctor en Bioquímica

A mis padres

A mi hermano

A Alberto

AGRADECIMIENTOS

Durante estos cuatro años de tesis, han sido muchos los momentos en los que he pensado cómo escribiría y cómo sería este apartado de la tesis. Pensaba que le dedicaría su tiempo, a hacer memoria, a pensar en todas aquellas personas que he conocido y me han acompañado a lo largo de este duro camino. Al final dejaba de darle vueltas a la cabeza, porque no se me ocurría la manera de expresar con palabras todo el agradecimiento que siento hacia todos ellos. Bueno, pues aquí me encuentro, escribiendo los agradecimientos a última hora y corriendo.

En primer lugar, me gustaría agradecer, a Manuel González-Guerrero la oportunidad que me blindó para hacer la tesis en su laboratorio. Hacer la tesis era mi sueño y mi principal objetivo, gracias por la confianza que pusiste en mí, desde el primer momento. Han sido cuatro años de aprendizaje y crecimiento continuo tanto, personal como profesional.

Gracias también a Juan Imperial, por su sabiduría infinita, por todos sus aportes científicos y toda su ayuda.

Los siguientes en la lista de “sin ellos no hubiera sido posible esta tesis” son, TODOS mis compis del laboratorio. Habéis sido para mí como una familia. Hemos compartido muchas cosas, problemillas en el trabajo, confidencias personales, momentos de mucho estrés de desesperación y también momentos muy divertidos y de muchas risas. En primer lugar, y siguiendo un orden jerárquico, muy tradicional en nuestro laboratorio, empezaré dando las gracias a todos los post-docs que han pasado o que aún siguen en el laboratorio. Queridos post-docs, no fabrican quesos suficientes en el pueblo de Villahermosa para agradecer todo lo que me habéis ayudado y aportado durante este tiempo. Gracias a Ángela, Manolo, Vivi, Isidro y Jesús por vuestro apoyo, por las horas dedicadas a enseñarme todo lo que sabéis y por vuestra disponibilidad, de verdad, mil gracias.

A todos mis compis pre-docs, que los quiero como si fueran hermanos míos. Gracias a Marta, por todo el apoyo y por tus palabras de consuelo; gracias a Javi, porque eres super divertido y molas un montón y gracias a Patri, por toda su ayuda y por recordarme siempre lo divertido que es trabajar con los transportadores YSL.

Quiero hacer un agradecimiento especial a Amalia, querida amiga y me atrevería a decir casi hermana, cuando acabes tu tesis, vas a tener dos, la mía y la tuya. No tengo palabras para agradecerte todo tu apoyo durante estos cuatro años. Me conoces tan bien que sabes cuando estoy bien y cuando estoy mal, y me das todo tu apoyo de forma espontánea y sin pedir nada a cambio. Tenemos muchas experiencias compartidas, hemos compartido momentos de mucho bajón, y momentos muy buenos de muchas risas y también mucha fiesta, aunque menos de la que nos hubiera gustado. Gracias por compartir estos años conmigo, eres una compi y una amiga 10.

Gracias al resto de compis pre-docs del CBGP, no voy a nombrarlos a todos porque seguro que me dejo alguno. Gracias por las charlas de autobuses y por los momentos de desconexión-cerveceo, son lo mejor de toda la tesis sin lugar a duda.

Gracias a todos los que forman parte de mi familia verdadera.

Gracias a Alberto, por ser mi compañero durante estos años, por aguantarme en mis malos momentos, por apoyarme siempre. Esta tesis es tanto mía, como tuya.

Gracias papá por dar siempre lo mejor de ti, por enseñarnos a ser constantes, respetuosos, generosos, (a ser puntuales no, eso se ha atascado un poco). Gracias por tus palabras y tus consejos siempre me hacen sentir mejor. Gracias por estar ahí siempre, por darnos todo lo que tienes.

Gracias mamá por tu apoyo siempre incondicional, por tus consejos y tu forma de ver la vida, divertida y alegre. Y sobre todo, gracias por alimentarme durante la tesis, tus tupper han sido mi salvación.

Gracias a los mejores padres del mundo, gracias a ellos estoy aquí, terminando de escribir esta tesis doctoral. Esta tesis también es vuestra. Ya sois doctores en medicina y en biotecnología. Os quiero.

Gracias a mi hermano, mi brother, mi Javichu y ahora también mi médico. Gracias por estar ahí siempre. En los momentos en los que más necesitaba hablar con alguien, ahí estabas tú, aunque fueran las 3 de la mañana en España y por Skype. Gracias por ser como eres, te quiero.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
1. IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. SIMBIOSIS RIZOBIO- LEGUMINOSA	4
1.1. Establecimiento de la simbiosis y formación del nódulo	5
1.2. Transporte e intercambio de nutrientes entre simbiosis	8
2. LOS METALES DE TRANSICIÓN EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.	13
2.1. Transportadores que extruyen metales del citosol	16
2.2. Transportadores que introducen metales en el citosol.	19
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.	35
1.1. <i>Medicago truncatula</i>	35
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
1.3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
1.5. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	37
1.6. <i>Escherichia coli</i>	38
1.7. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	38
1.8. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE RIEGO	38
2.1. Medios y soluciones de riego para el cultivo de plantas	38
2.1.1. Medio Fahreaus	38
2.1.2. Solución Jenner	38
2.1.3. Medio MS (Murashige & Skoog).	39
2.2. Medios para el cultivo de levaduras	39
2.2.1. YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)	39
2.2.2. SD (Synthetic Dextrose)	39
2.3. Medios para el cultivo de bacterias	40
2.3.2. YMB (Yeast Mannitol Broth)	40
2.3.3. LB (Luria-Bertani)	40
2.3.4. SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)	40
2.3.5. SOB (Super Optimal Broth)	41
2.3.6. TB (Terrific Broth)	41
3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	41
3.1. Extracción de ADN genómico para genotipado de mutantes de <i>M. truncatula</i>	41
3.2. Extracción de ADN genómico de plantas	42
3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias	43

3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras	43
3.5. Extracción de ARN de plantas	44
3.6. Cuantificación de ADN y de ARN	46
3.7. Electroforesis no desnaturizante de ácidos nucleicos	46
3.8. Electroforesis desnaturizante para visualización de ARN	46
3.9. Recuperación de ADN desde geles de agarosa	47
4. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	47
5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	48
5.1. PCR para amplificación de fragmentos (no cuantitativa)	48
5.1.1. PCR para el clonaje de secuencias	48
5.1.2. PCR para la comprobación de fragmentos de ADN	49
5.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	50
5.3. Oligonucleótidos	51
6. CLONACIÓN	54
6.1. Vectores usados	54
6.2. Clonación Gateway	55
6.3. Clonación mediante ligación de fragmentos de restricción	56
6.4. Clonación por recombinación homóloga	57
7. TRANSFORMACIÓN	57
7.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	57
7.1.1. Preparación de células quimiocompetentes	58
7.1.2. Transformación de células quimiocompetentes	58
7.1.3. Preparación de células electrocompetentes	58
7.1.4. Transformación de células electrocompetentes	59
7.2. Transformación de <i>Agrobacterium</i>	59
7.2.1. Preparación de células electrocompetentes	59
7.2.2. Transformación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium</i>	60
7.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	60
7.4. Transformación de <i>M. truncatula</i>	61
7.5. Transformación de <i>N. benthamiana</i>	61
7.6. Transformación de <i>A. thaliana</i>	63
8. DETECCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA (GUS)	63
9. INMUNOLocalIZACIÓN	64
10. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES	66
11. LOCALIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE HIERRO	66
12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA	68
13. BIOINFORMÁTICA	68
13.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos	68
13.2. Estructura de la proteína	70
13.3. Diseño de oligonucleótidos	71
13.4. Análisis de transcritos de <i>S. meliloti</i> y <i>M. truncatula</i>	71
RESULTADOS	73
1. MtNRAMP1	75
1.1. <i>M. truncatula</i> tiene 7 miembros de la familia de transportadores Nramp	75
1.2. <i>MtNramp1</i> es el gen de la familia Nramp con mayor expresión en nódulos	76
1.3. <i>MtNramp1</i> transporta hierro y manganeso hacia el citoplasma	78
1.4. <i>MtNramp1</i> se localiza en la membrana plasmática de las células de la zona de infección del nódulo	80

1.5. La mutación de <i>MtNramp1</i> provoca una disminución en la actividad nitrogenasa	85
2. MtYSL	96
2.1. <i>M. truncatula</i> tiene 9 miembros de la familia de transportadores YSL	96
2.2. MtYSL1	98
2.2.1. MtYSL1 se induce en el nódulo	98
2.2.2. MtYSL1 se localiza en la membrana de las células que rodean los vasos, y en las células del parénquima del nódulo	99
2.2.3. MtYSL1 no transporta metal-NA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
2.2.4. MtYSL1 es capaz de transportar péptidos de entre 4 y 6 aminoácidos	107
2.2.5. La mutación de MtYSL1 provoca una disminución en la actividad nitrogenasa	109
2.3. MtYSL8	117
2.3.1. MtYSL8 presenta una alta expresión en los nódulos de <i>M. truncatula</i>	117
2.3.2. MtYSL8 se localiza alrededor de los haces vasculares del nódulo	117
2.3.3. MtYSL8 es funcionalmente equivalente a AtYSL1 y AtYSL3	121
2.3.4. La mutación de MtYSL8 provoca una disminución de actividad nitrogenasa	122
DISCUSIÓN	129
Transporte de hierro desde el apoplasto hacia el interior de las células infectadas del nódulo	131
Transporte de metales desde el cilindro vascular hacia el apoplasto del nódulo	134
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama e imagen de microscopía óptica de un nódulo indeterminado de <i>M. truncatula</i>	7
Figura 2. Diagrama del transporte y metabolismo en las células del nódulo.	9
Figura 3. Transporte de metales en el nódulo.	23
Figura 4. Diagrama que representa las combinaciones de oligonucleótidos usados para la comprobación de la segregación de los mutantes Tnt1 de <i>M. truncatula</i> .	47
Figura 5. Familia Nramp en <i>M. truncatula</i>	70
Figura 6. Expresión de los genes de la familia Nramp en raíces y nódulo	71
Figura 7. Expresión génica de la familia <i>MtNramp</i> .	72
Figura 8. Estructura terciaria de MtNramp1	73
Figura 9. Experimento de transporte de MtNramp1	74
Figura 10. Localización tisular de MtNramp1	76
Figura 11. Complementación de levaduras <i>smf1</i> con <i>MtNramp1-HA</i>	77
Figura 12. Localización subcelular de MtNramp1-HA	78
Figura 13. Control de especificidad de anticuerpo para microscopía confocal.	79
Figura 14. Expresión de MtNramp1 en diferentes zonas del nódulo de <i>M. truncatula</i> .	79
Figura 15. Localización de MtNramp1-HA en raíz.	80
Figura 16. Línea mutante por la inserción de <i>Tnt1</i> en <i>MtNramp1</i>	81
Figura 17. Fenotipo del mutante <i>nramp1-1</i> en condiciones no-simbióticas.	82
Figura 18. Fenotipo de plantas WT de <i>M. truncatula</i> , mutantes <i>nramp1-1</i> y <i>nramp1-1</i> transformadas con <i>MtNramp1</i> en condiciones simbióticas.	84
Figura 19. Complementación con hierro del fenotipo <i>nramp1-1</i> .	86
Figura 20. Distribución de hierro en raíces y en nódulos en plantas WT y <i>nramp1-1</i>	87
Figura 21. Expresión de <i>MtMATE</i> en diferentes zonas del nódulo de <i>M. truncatula</i> .	87
Figura 22. Complementación del fenotipo de <i>nramp1-1</i> por <i>MtNramp1</i> bajo la regulación de un promotor específico de nódulo.	88
Figura 23. Fenotipo de plantas <i>nramp1-1</i> en condiciones no simbióticas, en deficiencia de manganeso	90
Figura 24. Fenotipo de <i>nramp1-1</i> en condiciones simbióticas bajo dos concentraciones diferentes de manganeso	90
Figura 25. Familia YSL en <i>M. truncatula</i>	92
Figura 26. Expresión génica de MtYSL1	93
Figura 27. Localización tisular de MtYSL1	95
Figura 28. Localización subcelular de MtYSL1	97
Figura 29. Localización de MtYSL1 en raíz	98

Figura 30. Co-Localización de MtYSL1 y AtPIP2 en hojas epidérmicas de <i>N. benthamiana</i> .	99
Figura 31. Ensayo de transporte de metal-NA por complementación en levaduras.	101
Figura 32. Ensayo de transporte de hierro en <i>Atysl1ysl3</i> .	102
Figura 33. Ensayo del transporte de GSH por MtYSL1	103
Figura 34. Ensayo transporte de péptidos por MtYSL1.	104
Figura 35. Líneas mutantes por la inserción de <i>Tnt1</i> en MtYSL1.	105
Figura 36. Fenotipo de plantas WT y mutantes <i>ysl1-1</i> y <i>ysl1-2</i> en condiciones no simbióticas	107
Figura 37. Fenotipo de plantas WT y mutantes <i>ysl1-1</i> y <i>ysl1-2</i> en condiciones simbióticas	108
Figura 38. Contenido de metales en plantas control y mutantes <i>ysl1-2</i> .	108
Figura 39. Fenotipo de <i>ysl1-2</i> en condiciones de deficiencia y exceso de hierro	110
Figura 40. Fenotipo de <i>ysl1-2</i> en condiciones de deficiencia y exceso de cobre.	110
Figura 41. Fenotipo de <i>ysl1-2</i> en condiciones de deficiencia y exceso de zinc.	111
Figura 42. Expresión génica de MtYSL8	112
Figura 43. Localización tisular de MtYSL8 en raíces y nódulos.	113
Figura 44. Localización subcelular de MtYSL8-HA	116
Figura 45. Localización de MtYSL1 en raíz	116
Figura 46. Ensayo de transporte de hierro en <i>Atysl1ysl3</i> .	117
Figura 47. Líneas mutantes por la inserción de <i>Tnt1</i> en MtYSL8	118
Figura 48. Topología de MtYSL8 y del transcrito modificado detectado en el mutante <i>ysl8-1</i>	119
Figura 49. Fenotipo de plantas WT y mutantes <i>ysl8-1</i> y <i>ysl8-2</i> en condiciones simbióticas	120
Figura 50. Fenotipo de plantas WT y mutantes <i>ysl8-1</i> y <i>ysl8-2</i> en condiciones no simbióticas	121
Figura 51. Contenido de metales en plantas control y mutantes <i>ysl8-1</i> .	122
Figura 52. Modelo propuesto para el transporte de metales desde el cilindro vascular del nódulo hasta las células infectadas	134

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> usadas en esta Tesis Doctoral	32
Tabla 2. Cepas de <i>S. meliloti</i> usadas en esta Tesis Doctoral	33
Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i> usadas en esta Tesis Doctoral.	34
Tabla 4. Concentraciones de los reactivos de PCR empleados para el clonaje de secuencias	45
Tabla 5. Condiciones estándar de PCR utilizadas.	45
Tabla 6. Concentraciones de los reactivos usados para PCR	45
Tabla 7. Condiciones de PCR usadas	46
Tabla 8. Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas	47
Tabla 9. Oligonucleótidos usados.	48
Tabla 10. Vectores usados	50
Tabla 11. Condiciones y reactivos para corte con enzimas de restricción	52

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
AFN	Parte Aérea Fertilizada con Nitrógeno
Amp	Ampicilina
AN	Parte Aérea Nodulada
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Asparagina sintetasa
Asn	Asparagina
BE	β -estradiol
bp	Pares de bases
BSA	Del inglés " <i>Bovine serum albumin</i> "
bv	Biovar
CDS	Secuencia codificante del inglés " <i>Coding Sequence</i> "
CDF	Del inglés " <i>Cation Diffucion Facilitator</i> ", véase también MTP.
CFP	Proteína cian fluorescente; del inglés " <i>Cian Fluorescent Protein</i> "
COPT	Del inglés " <i>Copper Transporter</i> ", véase también CTR
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CTR	Del inglés " <i>Copper Transporter</i> ", véase también COPT
DAPI	Del inglés " <i>4',6-diamidino-2-phenylindol</i> "
DMA	Ácido desoximugineico; del inglés " <i>DeoxyMugineic Acid</i> "
DMT1	Del inglés " <i>Drug/Metabolite Transporter</i> "
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dNTPs	Del inglés " <i>deoxynucleotide triphosphates</i> "
dpi	Días post-inoculación.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
FPN	Ferroportina
FRO	Del inglés " <i>Ferric-chelate Reductase Oxidase</i> "
FSN	Fijación Simbiótica de Nitrógeno
GFP	Proteína verde fluorescente; del inglés " <i>Green Fluorescent Protein</i> "

Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
Gm	Gentamicina
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
His	Histidina
HMA	Del inglés <i>"Heavy Metal P-type ATPase"</i>
ICP-MS	Espectometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
Ile	Isoleucina
IRT	Del inglés <i>"Iron Regulated Transporter"</i>
Km	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
Leu	Leucina
MATE	Del inglés <i>"Multi-Antimicrobial Extrusion protein"</i>
MES	Del inglés <i>"2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid"</i>
MFS	Del inglés <i>"Major Facilitator Superfamily"</i>
MOPS	Del inglés <i>"3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid"</i>
MTP	Del inglés <i>"Metal Transporter Protein"</i> veáse también CDF
NA	Nicotianamina
NAS	Nicotianamina Sintasa
Nod	Nódulo
Nramp	Del inglés <i>"Natural Resistance-Associated Macrophage Protein"</i>
OAA	Oxalacetato
OD	Densidad Óptica
OD ₆₀₀	Densidad Óptica de 600 nm
OPT	Del inglés <i>"Oligopeptide Transporter"</i>
PBS	Tampón fosfato salino; del inglés <i>"Phosphate-buffered saline"</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés <i>"Polymerase Chain Reaction"</i>
PEG	Polietilen-glicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
p/v	Peso/Volumen

qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real; del inglés <i>"Quantitative Real Time PCR"</i>
RD	Raíz Denodulada
RFN	Raíz Fertilizada con Nitrógeno
Rif	Rifampicina
ROS	Especies reactivas de oxígeno; del inglés <i>"Reactive Oxygen Species"</i>
SD	Del inglés <i>"Synthetic Defined medium"</i>
SDS	Del inglés <i>"Sodium Dodecyl Sulphate"</i>
SOB	Del inglés <i>"Super Optimal Broth"</i>
SOC	Del inglés <i>"Super Optimal broth with Catabolite repression"</i>
SOD	SuperÓxido Dismutasa; del inglés <i>"SuperOxide Dismutase"</i>
SS	Sacarosa sintasa
Str	Estreptomicina
S-XRF	Del inglés <i>"Synchrotron X-Ray Fluorescence"</i>
TB	Del inglés <i>"Terrific Broth"</i>
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
TY	Del inglés <i>"Tryptone Yeast"</i>
TXRF	Del inglés <i>"Total X-Ray Fluorescence"</i>
v/v	Volumen/Volumen
Val	Valina
WT	Tipo salvaje; del inglés <i>"wild-type"</i>
YMB	Del inglés <i>"Yeast Mannitol Broth"</i>
YPD	Del inglés <i>"Yeast extract Peptone Dextrose"</i>
YSL	Del inglés <i>"Yellow Stripe-Like"</i>
ZIP	Del inglés <i>"Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein"</i>

ABSTRACT

Symbiotic nitrogen fixation carried out by the interaction established between legumes and diazotrophic bacteria known as rhizobia is a primary source of assimilable nitrogen in natural ecosystems, and a key element in many strategies of sustainable agriculture. This physiological process is carried out by endosymbiotic bacteria living with differentiated root organs, the nodules. Symbiotic nitrogen fixation requires relatively large amounts of transition metals as essential cofactors of many of the enzymes participating in it. In this PhD Thesis, we identified and characterized some of the transporters responsible for metal delivery to nodules. We have identified two YSL family members, MtYSL1 and MtYSL8, located in the vasculature in root and nodules. These genes are expressed at high levels in nodules, and seem to play a relevant role in nitrogen fixation, since when they are mutated, nitrogen fixation rates are reduced. Based on their localization and expression profile, their most likely role is metal extrusion from the vasculature into the apoplast in the nodule. There, a number of metal transporters must introduce apoplastic metals into the rhizobia-infected cells. We have identified one of these transporters, MtNramp1, as the one responsible for iron uptake by these cells. *MtNramp1* is expressed by endodermal cells in the roots and by the cells in the infection zone of the nodule, where it is inserted in the plasma membrane. Mutation of *MtNramp1* results in a severe reduction of nitrogenase activity, the likely result of iron not being taken up and nitrogenase missing an essential cofactor. This phenotype is complemented by watering the plants with an iron-fortified nutrient solution, transformation with a wild-type copy of the mutated gene under its own promoter, or under a nodule-specific promoter. The last result indicates that the primary role of MtNramp1 is iron uptake by rhizobia-infected cells and not long-distance iron transport.

RESUMEN

La fijación simbiótica de nitrógeno llevada a cabo por la interacción establecida entre las leguminosas y bacterias diazotróficas conocidas como rizobios, es una fuente primaria de nitrógeno asimilable en ecosistemas naturales, y un elemento esencial en muchas estrategias de agricultura sostenible. Este proceso fisiológico es llevado a cabo por bacterias endosimbióticas que viven en unos órganos diferenciados en la raíz, los nódulos. La fijación simbiótica de nitrógeno requiere de cantidades relativamente grandes de metales de transición como cofactores esenciales de muchas de las enzimas que participan en ella. En esta Tesis Doctoral, hemos identificado y caracterizado algunos de los transportadores responsables de la entrega de metales a los nódulos. Hemos identificado dos miembros de la familia YSL, *MtYSL1* y *MtYSL8*, localizados en los vasos de la raíz y nódulos. Estos genes se expresan a altos niveles en los nódulos, y parece jugar un papel relevante en la fijación de nitrógeno, dado que cuando están mutados, la tasa de fijación de nitrógeno se reduce. Basándonos en su localización y patrón de expresión, su papel más probable es la salida de metales desde los vasos al apoplasto del nódulo. Allí, varios transportadores de metales han de introducir los metales apoplásticos a las células infectadas con rizobios. Hemos identificado uno de estos transportadores, *MtNramp1*, como el responsable de introducir hierro en estas células. *MtNramp1* se expresa en las células de la endodermis en las raíces, y en las células de la zona de infección de los nódulos, donde se inserta en la membrana plasmática. La mutación de *MtNramp1* resulta en una reducción severa de la actividad nitrogenasa, el resultado probable de que el hierro no se incorpore y la nitrogenasa carezca de un cofactor esencial. Este fenotipo se complementa regando las plantas con una solución nutritiva fortificada en hierro, transformando con una copia silvestre del gen mutado regulado por su propio promotor o por uno específico de nódulos. Este último resultado indica que la principal función de *MtNramp1* es la captación de hierro por células del nódulo y no el transporte a larga distancia de hierro.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un componente fundamental de los seres vivos. Constituye alrededor del 1 al 4% de la célula, formando parte de moléculas esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos (Woodmansee et al., 1978, Hirsch & Mauchline, 2015, Frink et al., 1999). A pesar de ser el elemento más abundante de la atmósfera, con un 78% de su volumen total, se trata de uno de los principales factores limitantes para el crecimiento de las plantas y por tanto, para la producción agrícola (Hirsch & Mauchline, 2015). Esto se debe, a que la mayor parte de este nitrógeno, se encuentra en forma de gas (N_2), que es inaccesible para las plantas, y a que las formas de nitrógeno biológicamente disponibles, tales como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+) están presentes en cantidades limitadas en el suelo. Es por ello, que, en el ámbito de producción agrícola, el nitrógeno asimilable, es frecuentemente aportado en forma de fertilizantes nitrogenados sintéticos para aumentar la producción (White & Brown, 2010).

Estos fertilizantes sintéticos han sido los responsables del enorme aumento en la producción agrícola, que ha sido capaz de sostener el aumento de la población mundial durante el siglo pasado (Gruber & Galloway, 2008). Sin embargo, existen costos, tanto económicos, como ambientales con el uso de los mismos. La fabricación de los fertilizantes se realiza principalmente mediante el proceso Haber-Bosch, el cuál es económicamente costoso, suponiendo más del 1,2% del consumo total de energía mundial (IFA, 2009). Anualmente se usan alrededor de 120 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados sintéticos para la producción alimenticia. Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno aplicado, entre un 60 y un 70%, no es utilizado por los cultivos, y se pierde a través del suelo por lixiviación o se libera a la atmósfera en forma de gas (Raun & Johnson, 1999, Kant et al., 2010). Debido a su alta solubilidad, los nitratos y el amonio presentes en los fertilizantes pueden alcanzar las reservas de agua de los acuíferos, ocasionando problemas que van desde la eutrofización, hasta la acidificación global de los sistemas acuáticos y terrestres (Robertson & Vitousek, 2009). Aguas contaminadas con nitratos y nitritos no son potables, y si éstos se encuentran en altas concentraciones, pueden dar lugar a diversos efectos negativos para la salud (Gutiérrez, 2012, Gruber & Galloway, 2008). Por otro lado, el uso de fertilizantes, contribuye a la contaminación ambiental, no sólo por los problemas de lixiviación en suelo, sino también porque éstos pueden generar óxido nítrico, un potente gas de efecto invernadero (Eichner, 1990). Por lo tanto, por razones comerciales y ambientales, es importante minimizar el uso de fertilizantes industriales, mediante técnicas agronómicas de optimización y mejora de cultivos, que adquieran o utilicen los nutrientes de manera más efectiva (Hirel et al., 2011).

1. IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso natural, eficiente y muy importante dentro del ciclo del nitrógeno, responsable de introducir la mayor parte del nitrógeno asimilable en los ecosistemas naturales (aproximadamente 260 TgN/año) (Fowler et al., 2013) . Esta FBN consiste en la reducción de N_2 atmosférico en amonio (NH_4^+) y es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa, la cual es producida exclusivamente por procariotas (bacterias y arqueas) de vida libre o en asociación simbiótica con plantas, en cuyo caso recibe el nombre de fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) (Dos Santos et al., 2012). Una de las asociaciones simbióticas de mayor interés agronómico, es la establecida entre diferentes géneros de bacterias diazotróficas del suelo, conocidas como rizobios y plantas de la familia *Leguminosae* (de Faria et al., 1989, Graham & Vance, 2003). Esta relación mutualista se lleva a cabo en las raíces de la planta, donde se forman órganos diferenciados, conocidos como nódulos y en cuyo interior, los rizobios transforman el N_2 atmosférico a NH_4^+ mediante la enzima nitrogenasa. Este amonio es usado por la planta como fuente de nitrógeno, mientras que las bacterias obtienen de la planta energía y los metabolitos necesarios para realizar dicho proceso (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Se estima, que la fijación de N_2 atmosférico por la asociación simbiótica entre rizobios y leguminosas, es del orden de 20-40 millones de toneladas (20-40 Tg) de nitrógeno al año (Herridge et al., 2008, Herridge, 2008, Peoples et al., 2009) . El coste energético en la producción de este nitrógeno fijado es mucho menor que el coste de una producción equivalente de fertilizantes sintéticos (Hirel et al., 2011). Esto hace de la FBN, una estrategia de agricultura sostenible para evitar el uso masivo de fertilizantes nitrogenados industriales, que tantos efectos negativos tienen en el medioambiente. Sin embargo, entre otros factores, la deficiencia de nutrientes minerales en los suelos agrícolas, limitan la FSN, reduciendo así los rendimientos, por debajo de su máximo potencial (O'Hara et al., 1988). Esta limitación de nutrientes para la producción de leguminosas, no sólo se deben a deficiencias de los macronutrientes más comunes (fósforo, potasio, azufre), sino también a micronutrientes, como el hierro, el cobre o el molibdeno (Guerinot, 1991, Seliga, 1993, O'Hara, 2001). Por lo tanto, es esencial comprender cuáles son las limitaciones impuestas por la deficiencia de estos nutrientes, e intentar optimizar la FBN mediante el uso de variedades mejoradas en el uso de los mismos.

La FBN llevada a cabo por la asociación simbiótica rizobio-leguminosa, es uno de los métodos más antiguos utilizados en la agricultura para la entrada de formas de nitrógeno asimilable en los sistemas agrarios. Mucho antes de la invención de los fertilizantes sintéticos, a principios del siglo XX, las leguminosas ya se incluían de forma rutinaria en las rotaciones de cultivo, con el fin de incrementar los nitratos del suelo para cultivos posteriores (Hirsch & Mauchline, 2015). Las leguminosas, con cerca de 20.000 especies y 750 géneros (Peix et al., 2015), constituyen la segunda fuente más importante de alimento para el ser humano y para el ganado, sólo por detrás de los cereales (Graham & Vance, 2003). Entre ellas se encuentran, cultivos de grano, como la soja, el guisante, la lenteja o el haba, y cultivos de forraje como son el trébol y la alfalfa. El cultivo de leguminosas se extiende en unas 180 millones de hectáreas, lo que corresponde al 12-15% de la superficie terrestre cultivable, suponiendo el 27% de la producción agrícola primaria. Solamente las leguminosas de grano contribuyen al 33% de las necesidades de nitrógeno de la dieta humana y proporcionan más del 35% del aceite vegetal procesado del mundo (Graham & Vance, 2003, Vance et al., 2000). Las bacterias presentes en el suelo capaces de establecer simbiosis con estas leguminosas son conocidas comúnmente como rizobios. Se trata de α -proteobacterias pertenecientes al orden Rhizobiales, donde 7 de sus 14 familias contienen géneros de rizobios clásicos como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*; *Mesorhizobium* o *Bradyrhizobium* (Sawada et al., 2003, MacLean et al., 2007). Algunas leguminosas tropicales son capaces también de establecer simbiosis con β -proteobacterias del género *Burkholderia* (Gyaneshwar et al., 2011).

1.1. Establecimiento de la simbiosis y formación del nódulo

Durante el establecimiento de la simbiosis y consiguiente formación del nódulo, tienen lugar dos complejos procesos de desarrollo: el de infección por parte de la bacteria y el de organogénesis del nódulo (Oldroyd et al., 2011). Ambos procesos ocurren simultáneamente a través de una comunicación química entre las bacterias y las raíces de planta huésped. La infección se inicia con la emisión de señales de quimiotaxis de la planta hacia el rizobio. La planta huésped secreta al suelo estas señales en forma de exudados radicales que contienen compuestos flavonoides fenólicos e isoflavonoides (Recourt et al., 1992, Charrier et al., 1995, Mathesius et al., 1998). Estos son reconocidos por los rizobios que, en respuesta, producen lipoquitooligosacáridos denominados factores de nodulación o factores Nod (Lerouge et al., 1990, Schmidt et al., 1994, Long, 1996). Ambos compuestos son específicos de especie, lo que

determina la especificidad de la simbiosis (Downie, 2010). Esto significa que, cada especie de leguminosa puede establecer una relación de simbiosis con un reducido número de especies bacterianas, por ejemplo, *Medicago truncatula* establece simbiosis principalmente con *Sinorhizobium meliloti*, mientras que *Glycine max* (soja) lo hace preferentemente con *Bradyrhizobium japonicum*.

Los factores Nod son reconocidos por la planta a través de receptores de membrana con dominios extracelulares LysM, que transmiten su señal mediante dominios quininas (Oldroyd, 2013, Zipfel & Oldroyd, 2017). A partir de ese momento, la infección desencadena una cascada de transducción de señales en las células radicales del hospedador, que producen cambios morfológicos y bioquímicos (Oldroyd & Downie, 2008). Uno de los primeros cambios que se produce, es la deformación y curvatura en forma de “cayado de pastor” del pelo radical de las células epidérmicas de la raíz (Esseling et al., 2003). Durante este proceso, las bacterias quedan atrapadas en un punto muy localizado (bolsillo de infección), donde tiene lugar la hidrólisis de la pared celular (Brewin, 2004). A partir de este punto, los rizobios comienzan a penetrar a través del pelo radical, por invaginación de la membrana plasmática, formando una estructura tubular conocida como canal de infección (Brewin, 1998). Las bacterias van multiplicándose y penetrando por el canal de infección hasta el córtex de la raíz, donde los canales de infección se ramifican. Al mismo tiempo, varias capas de células del córtex de la raíz, se empiezan a modificar, haciéndose más grandes y elongadas y sufriendo divisiones anticlinales y periclinales para formar el primordio del nódulo (Xiao et al., 2014). Las bacterias, desde el canal de infección, van accediendo a las células corticales, donde son liberadas en el citosol mediante un mecanismo similar a la endocitosis (Bassett et al., 1977), que rodea a la bacteria dentro de una membrana derivada de la planta (Brewin, 2004). En su interior, los rizobios sufren un proceso de elongación y diferenciación celular, para convertirse en bacteroides, que es la forma fijadora de nitrógeno (Vasse et al., 1990) (Figura 1). Se forma así una estructura similar a un orgánulo, llamado simbiosoma, donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno, y que está formado, por el bacteroide y la membrana simbiosomal, derivada de la membrana endocítica vegetal que lo envuelve (Roth Stacey, 1989, Kereszt et al., 2011). La membrana simbiosomal mantiene aislados a los bacteroides del citoplasma de la planta, por lo que ésta juega un papel fundamental en el intercambio metabólico entre los simbiosomas, regulando el transporte de metabolitos y nutrientes entre ellos (Udvardi Day, 1997). Los bacteroides continuarán creciendo y multiplicándose, hasta que las células vegetales infectadas del primordio del nódulo contengan miles de simbiosomas (Udvardi Poole, 2013).

La colonización rizobiana de los nódulos en desarrollo, se lleva a cabo en 14-28 días. Sin embargo, antes de que éstos comiencen a fijar nitrógeno, se produce un cambio en la fisiología de los nódulos. La planta crea un ambiente de microaerobiosis dentro del simbiosoma, necesario para que la enzima nitrogenasa pueda llevar a cabo su actividad. Los rizobios, tanto en vida libre como en simbiosis, son aerobios obligados, es decir, requieren oxígeno para su respiración y para el metabolismo energético. Sin embargo, en condiciones de fijación de nitrógeno, se encuentran un dilema. El O₂ necesario para respirar es capaz de inactivar a la nitrogenasa (Appleby, 1984). Por ello, la concentración de oxígeno en las proximidades de la enzima debe controlarse mediante mecanismos adecuados, con el fin de crear un ambiente de microaerobiosis en el simbiosoma (Becana Rodríguez - Barrueco, 1989). Uno de estos mecanismos es la leghemoglobina (de Billy et al., 1991). Ésta une con alta afinidad el oxígeno en el citoplasma y lo administra rápidamente a las mitocondrias y a los bacteroides, los cuáles presentan altas tasas de respiración y consumen el O₂ que inactivaría a la nitrogenasa.

En los nódulos ya maduros, que fijan nitrógeno, podemos distinguir, un tejido central formado principalmente por células vegetales infectadas, intercaladas con células no infectadas. Este tejido central, se encuentra rodeado por otros 5 tejidos de células no infectadas (Figura 1): el parénquima del nódulo, la endodermis, el córtex y los haces vasculares (incluidos los tejidos de floema y xilema), que conectan con el sistema vascular de la raíz y transportan elementos y compuestos dentro y fuera del nódulo (Bond, 1948, Udvardi Poole, 2013, Xiao et al., 2014). Según la especie de leguminosa, se pueden formar dos tipos de nódulos: nódulos determinados o nódulos indeterminados (Figura 1). Ambos tipos se distinguen principalmente por la ausencia o presencia de un meristemo apical persistente. Los nódulos determinados se caracterizan por desarrollar un meristemo transitorio que cumple su función hasta la formación del primordio del nódulo. Por lo que las etapas de desarrollo nodular están separadas en el tiempo (Kereszt et al., 2011). Éstos son característicos de especies como *Lotus japonicus*, *Glycine max* o *Phaseolus vulgaris*. Por el contrario, los nódulos indeterminados se caracterizan por tener un crecimiento continuo, debido a la presencia de un meristemo apical que mantiene su actividad de forma permanente. Como consecuencia, las etapas de desarrollo en estos nódulos están separadas en espacio. De este modo, en ellos se pueden fácilmente distinguir 4 zonas o etapas de desarrollo principales: la zona meristemática (I); la zona de infección (II), que es donde las bacterias se liberan desde los canales de infección, alcanzan las células, donde se diferenciarán a bacteroides; la zona de fijación (III) y la zona de senescencia (IV), que es la más próxima a la raíz, donde cesa

la fijación de nitrógeno (Figura 1). Especies como *M. truncatula* o *Pisum sativum* presentan este tipo de nódulos indeterminados. Esta organización permite el estudio temporal de la simbiosis observando las distintas zonas de un mismo nódulo (Vasse et al., 1990, Popp & Ott, 2011, Roux et al., 2014).

Figura 1: Diagrama e imagen de microscopía óptica de un nódulo indeterminado de *M. truncatula*. CI: canal de infección; Ci: célula infectada; HV: haz vascular; CNi: célula no infectada; End: endodermis; PQ: parénquima y Córtex. La imagen de microscopía óptica de la derecha pertenece a un nódulo de 28 dpi y no presenta zona IV.

1.2. Transporte e intercambio de nutrientes entre simbioses

Una relación de simbiosis mutualista se basa en una interacción donde ambos simbioses se ven beneficiados de algún modo. En todos los casos de simbiosis rizobio-leguminosa, la planta hospedadora proporciona a la bacteria energía proveniente de la actividad fotosintética, mientras que la bacteria proporciona a la planta formas de nitrógeno asimilables (Udvardi & Poole, 2013). Todos los componentes inorgánicos y orgánicos que la planta proporciona para el desarrollo de los nódulos se importan de otros órganos. Los fotosintatos son importados a los nódulos a través del floema para la obtención de energía por parte de los bacteroides (White et al., 2007), mientras que las formas de nitrógeno que la bacteria proporciona a la planta son incorporadas en aminoácidos al citoplasma de las células infectadas, e ingresan en el xilema, desde donde se distribuyen al resto de la planta (Udvardi & Poole,

2013). Esta transferencia de nutrientes debe implicar a numerosos transportadores en diferentes membranas (Benedito et al., 2006). La membrana del simbiosoma es una de las más caracterizadas ya que existen numerosos estudios de proteómica que han desvelado algunos transportadores que juegan un papel clave para la FSN (Mohd Noor et al., 2015). También el transporte de sacarosa y ácidos dicarboxílicos a través de las membranas del nódulo ha sido ampliamente estudiado (Vance et al., 1998, Ayre, 2011).

La energía que la planta le proporciona al bacteroide para la fijación de nitrógeno proviene de fotosintatos, que son transportados al nódulo en forma de sacarosa a través del floema (Vance, 2008, Gordon et al., 1999). Desde aquí, la sacarosa puede ser transportada al interior de las células del nódulo de dos formas: vía apoplasto, a través de transportadores de membrana plasmática, o vía simplasto, a través de plasmodesmos (Patrick, 1997). Se han descrito varios transportadores de azúcares, el primero fue LjSUT4 en *L. japonicus* (Flemetakis et al., 2003), miembro de la familia de transportadores SUT que realizan un simporte sacarosa/H⁺ (Lemoine, 2000). LjSUT4 se localiza en los haces vasculares, córtex interior y en células infectadas y no infectadas de los nódulos. Por este motivo, cabría esperar que fuera el responsable de introducir la sacarosa a través de los haces vasculares hacia el interior del nódulo. Sin embargo, una publicación posterior localizó a LjSUT4 en el tonoplasto (Reinders et al., 2008), donde transportaría un amplio rango de azúcares, incluyendo sacarosa y maltosa. De este modo, su función podría ser la de transportar azúcares almacenados en la vacuola para su uso en el citoplasma (Reinders et al., 2008), y no la de introducir la sacarosa procedente de la fotosíntesis directamente en el apoplasto del nódulo. Recientemente se ha descrito un transportador de la familia SWEET en *M. truncatula*, MtSWEET11, que podría desempeñar dicha función (Kryvoruchko et al., 2016). Éste es un transportador de sacarosa, y se ha localizado en haces vasculares, en la membrana plasmática de las células no infectadas adyacentes, así como en la membrana de los simbiosomas. Por ello, MtSWEET11, parece tener diferentes papeles en el transporte de sacarosa dentro del nódulo. (Figura 2).

Figura 2: Diagrama del transporte y metabolismo en las células del nódulo. La sacarosa viaja desde la parte aérea por el floema hasta el nódulo. Una vez convertida en malato, cruza la membrana simbiosomal a través del sistema de transporte Dct y entra en el bacterioide, donde sirve de aporte energético para llevar a cabo la FSN. El amonio resultante de la fijación, difunde a través de la membrana del bacterioide hacia el espacio peribacteroidal donde es protonado. Desde aquí atraviesa la membrana simbiosomal a través de un transportador aún desconocido hacia el citoplasma de célula vegetal. Una vez aquí, el nitrógeno fijado es exportado hacia la parte aérea de la planta formando parte de aminoácidos como Asn o Gln (flechas rojas). La planta proporciona al bacterioide aminoácidos como Ile, Leu o Val a través de transportadores Aap y Bra. Otros nutrientes minerales como fosfatos y sulfatos son también aportados por la planta mediante transportadores localizados en la membrana del simbiosoma, que aún no se han descrito por completo. Adaptación de (Udvardi & Poole, 2013).

Las células no infectadas del nódulo parecen tener una importante función en el transporte de estos fotosintatos hacia las células infectadas (White et al., 2007). Dentro de estas células no infectadas, la sacarosa sintasa (SS) convierte la sacarosa en monosacáridos (hexosas: glucosa y fructosa), que entran en glucólisis para producir fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato (Day & Copeland, 1991, White et al., 2007). Este último se carboxila para formar oxalacetato (OAA), el cuál es reducido a malato, que es considerado la primera fuente de carbono para los bacteroides (Vance & Gantt, 1992, Udvardi & Poole, 2013). El malato producido en células no infectadas, podría moverse hacia las células infectadas adyacentes vía simplasto a través de plasmodesmos (Kryvoruchko et al., 2016) (Figura 2). Esto se ha demostrado en nódulos de *Vicia faba*, donde se ha visto que las células no infectadas son capaces de importar azúcares, mientras

que las infectadas no pueden hacerlo (Peiter & Schubert, 2003). Por lo tanto, las células no infectadas podrían ser las responsables de suministrar el carbono en forma de ácidos dicarboxílicos a las células infectadas, vía simplasto. Una vez en el citoplasma, éstos deben atravesar la membrana simbiosomal para llegar hasta los bacteroides, y lo hacen a través de un sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos (Dct) (Watson, 1990, Reid & Poole, 1998, Yurgel & Kahn, 2004). Éste está formado por un transportador de membrana MFS (DctA) y dos componentes senso-reguladores (DctBD) (Yurgel & Kahn, 2004). DctB es el sensor que está unido a la membrana y detecta los dicarboxilatos fuera de la célula. DctD es capaz de activar la transcripción del transportador DctA, que introduce el malato en el interior del bacteroide, donde entra en el ciclo de Krebs para generar los equivalentes de reducción y ATP necesario para la fijación de nitrógeno (Figura 2).

Otro de los aspectos fundamentales de la simbiosis rizobio-leguminosa es cómo los bacteroides suministran el nitrógeno en formas asimilables para la planta. El N_2 fijado, difunde a través de la membrana del bacteroide, como NH_3 hacia el espacio peribacteroidal, donde, debido a su pH ácido, el NH_3 , es protonado a NH_4^+ (Figura 2). Desde aquí, el amonio tiene que pasar a través de la membrana simbiosomal, para lo cual se han descrito varias opciones. Una de ellas es que exista un canal de NH_3 (Niemietz & Tyerman, 2000), o un canal de cationes inespecífico (para K^+ , Na^+ y NH_4^+) (Tyerman et al., 1995), incluso, que el NH_4^+ sea capaz de pasar a través de canales tipo acuaporina, ya que éstos son muy abundantes en la membrana simbiosomal (Dean et al., 1999, Guenther & Roberts, 2000). En concreto, una de ellas, la Nodulina 26 de soja, es una de las proteínas más abundantes en la membrana del simbiosoma, constituyendo el 10% del contenido proteico total (Dean et al., 1999) y se ha demostrado que a través de ella es capaz de pasar el NH_4^+ (Hwang et al., 2010). Aunque existen transportadores para amonio de alta afinidad (AMT) (LjAMT2) (Simon-Rosin et al., 2003), y transportadores de K^+ de la familia KUP (LjKUP) (Desbrosses et al., 2004) en nódulos de leguminosas, éstos se encuentran localizados en la membrana plasmática de las células del nódulo, por lo que no estarían involucrados en transporte de amonio a través de la membrana del simbiosoma (Udvardi & Poole, 2013). Una vez liberado al citosol, el NH_4^+ es incorporado a amino ácidos a través del ciclo de la glutamina sintasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT), aspartato aminotransferasa (AAT) y asparagina sintetasa (AS) (Vance & Gantt, 1992). El nitrógeno asimilable en forma de aminoácidos, es liberado al xilema de la planta como asparagina o glutamina, generalmente en leguminosas con nódulos indeterminados, o como ureidos en

nódulos determinados (Collier & Tegeder, 2012, Baral et al., 2016). En *P. vulgaris* se ha identificado el transportador PvUPS1, localizado en el floema, que podría estar involucrado en el transporte de estos ureidos hacia la planta hospedadora (Pelissier et al., 2004).

A pesar de ser los bacteroides los encargados de sintetizar el NH_4^+ a partir del N_2 atmosférico, estos no asimilan el amonio dentro de su metabolismo, sino que lo secretan, siendo la planta hospedadora la encargada de suministrar directamente los aminoácidos a la bacteria (Lodwig et al., 2003). Aunque los rizobios en vida libre poseen transportadores AMT para la captación de amonio, éstos tienen reprimida su expresión en simbiosis. Este fenómeno se conoce como auxotrofia simbiótica (Prell et al., 2010), ya que la bacteria interrumpe la captación de amonio y la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) cuando se encuentra en simbiosis, cediendo el control de la biosíntesis de estos componentes a la planta. Esta auxotrofia se ha descrito en bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* y de *S. meliloti*, por lo que ambos reciben los aminoácidos ramificados por parte de la planta, a través de transportadores específicos (Prell et al., 2009). En bacteroides de *R. leguminosarum* se han identificado dos operones de transportadores de aminoácidos, *AapJQMP* y *BraDEFGC*, que pertenecen a la familia de transportadores ABC y que son necesarios para llevar a cabo la FSN (Walshaw & Poole, 1996, Hosie et al., 2002, Lodwig et al., 2003) (Figura 2). En dobles mutantes *aap* y *bra* de *R. leguminosarum* se ha visto un bloqueo total en el transporte de un amplio rango de aminoácidos incluyendo glutamato, aspartato y leucina. Esto se traduce en una disminución en la fijación de nitrógeno por parte de estos bacteroides, ya que no son capaces de recibir estos aminoácidos por parte de la planta hospedadora (Lodwig et al., 2003). Sin embargo, esto no ocurre cuando *aap* y *bra* (*liv*) son mutados en *S. meliloti*. Cuando estos dobles mutantes se encuentran en simbiosis con alfalfa, no se detectan defectos en la FSN, indicando que estos bacteroides, necesitan menos cantidad de aminoácidos, o que estos son suministrados por otro tipo de transportadores (Prell et al., 2010).

La membrana simbiosomal no sólo regula los flujos de carbono y de nitrógeno hacia y desde los bacteroides, sino también el de otros elementos necesarios para el metabolismo bacteriano, incluyendo azufre, fósforo, magnesio, hierro o cobre. Aunque la forma en que todos estos compuestos son transportados desde la planta al bacteroide, no se encuentran caracterizadas en muchos de los casos, estudios de proteómica de la membrana del simbiosoma han desvelado algunos transportadores. Así, en *L. japonicus*, se ha descrito un transportador de sulfato (SO_4^{2-}), LjSST1, localizado en la membrana simbiosomal, y que está implicado en el

transporte de sulfato desde el citoplasma de la célula hospedadora hasta los bacteroides (Krusell et al., 2005). Al igual que ocurre con el sulfato, el fosfato es muy abundante en los bacteroides, ya que aproximadamente un tercio del fosfato de los nódulos está presente en los bacteroides (Gaude et al., 2004). Este fosfato es transportado en *S. meliloti* por 3 sistemas, uno de baja afinidad, OrfA-Pit (Bardin et al., 1998) y otros dos de alta afinidad como son PstSCAB y PhoCDET (Yuan et al., 2006, Bardin et al., 1996). Este último operon, PhoCDET, codifica para un sistema de transporte tipo ABC, que es esencial para la simbiosis entre *S. meliloti* 1021 y la alfalfa (Bardin et al., 1996). Sin embargo, los nódulos de alfalfa formados por la cepa 2011, expresan el sistema de captación de fosfato de baja afinidad OrfA-Pit, y no expresan los sistemas de alta afinidad PstSCAB ni PhoCDET. Estos datos parecen indicar, que el fosfato no es un nutriente limitante en los bacteroides de los nódulos de alfalfa (Yuan et al., 2006), dado que sólo con el sistema de baja afinidad OrfA-Pit, es suficiente para un correcto funcionamiento de los bacteroides en el nódulo.

A pesar del conocimiento parcial que se tiene actualmente, sobre el intercambio y transporte de algunos nutrientes entre simbioses, se desconoce cómo otros elementos esenciales, y limitantes para la FSN llegan al nódulo y a los bacteroides. Por ejemplo, se tiene muy poca información acerca del transporte de nutrientes inorgánicos como hierro, cobre, zinc, molibdeno y otros metales de transición, hacia el nódulo. La baja disponibilidad de estos elementos en los suelos de cultivo (Guerinot, 1991), provocan bajos rendimientos en la FSN. Por ello, es necesario un mayor conocimiento en el transporte de estos nutrientes (localización, expresión y función de sus transportadores), para optimizar su uso por parte de la planta y así poder realizar mejoras en la FSN.

2. LOS METALES DE TRANSICIÓN EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.

Metales de transición como son el hierro, el cobre, el zinc, el manganeso o el molibdeno, son micronutrientes esenciales para las plantas (Hansch & Mendel, 2009, Pilon et al., 2009). Forman parte del centro activo de proteínas y enzimas, participando en la mayor parte de los procesos biológicos de la planta, desde la fotosíntesis, hasta la producción de semillas (González-Guerrero et al., 2016). Se estima que entre el 30-50% de las proteínas de una célula son metaloproteínas (Finkelstein, 2009, Waldron & Robinson, 2009). Sin embargo, las plantas, a menudo, se encuentran en suelos con baja disponibilidad de metales (White & Broadley, 2009), ya que estos, se encuentran unidos fuertemente a las partículas del suelo, haciéndolos difícilmente accesibles, especialmente en suelos alcalinos (Grotz & Guerinot, 2006). Frente a

este dilema, las plantas han desarrollado diferentes sistemas de captación de metales: (i) mediante la liberación de protones que acidifican la rizosfera, aumentando así la solubilidad de los metales (Palmer & Guerinot, 2009, Kobayashi & Nishizawa, 2012), (ii) mediante la secreción de sustancias quelantes (Palmer & Guerinot, 2009, Alvarez-Fernández et al., 2014) o (iii) mediante la asociación con otros organismos de la rizosfera, bien usando los metales solubilizados por otros microorganismos o mediante la asociación con hongos micorrízicos para abarcar un área de suelo más amplia (Philippot et al., 2013, González-Guerrero et al., 2016).

En el caso de las leguminosas, esta demanda de metales es mayor, al contar con un órgano sumidero extra, el nódulo. Además de los procesos metabólicos comunes con el resto de plantas, las leguminosas, ven incrementada la demanda de metales cuando establecen simbiosis (Tang et al., 1990), ya que muchos de ellos son cofactores de proteínas clave para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. La enzima directamente responsable de la fijación del N_2 atmosférico a amonio, la nitrogenasa, representa un 10% del total de las proteínas del bacteroide y contiene un cofactor de hierro-molibdeno (FeMoco) exclusivo de esta proteína y dos grupos Fe-S [4Fe-4S y 8Fe-7S] (Miller et al., 1993). Por otro lado, la proteína más abundante en el nódulo, la leghemoglobina (constituye el 20% de la proteína total), incorpora un grupo prostético hemo (Appleby, 1984). Otras metaloenzimas, menos abundantes, pero que también tienen un papel importante en la FSN, son las citocromo oxidases tipo-*cbb3* de alta afinidad, en las cadenas de transporte electrónico de los bacteroides (Preisig et al., 1996b, Preisig et al., 1993). Éstas tienen cofactores de hierro y cobre y se caracterizan por tener una alta afinidad por el O_2 , de forma que son capaces de captarlo y obtener energía aun estando éste 10.000 veces menos concentrado que en la atmósfera (King et al., 1988, Brown & Walsh, 1994, Preisig et al., 1996b, Zufferey et al., 1996). Hierro, cobre y zinc y manganeso también forman parte de los tres tipos de superóxido dismutasas (SOD) que se han encontrado en nódulo (Fe-SOD, CuZn-SOD y Mn-SOD) (Rubio et al., 2004, Rubio et al., 2007). Todas ellas cumplen una función muy importante en la detoxificación de los radicales libres producidos como productos secundarios durante la FSN (Rubio et al., 2007, Becana et al., 2010). A esta función también contribuyen otras metaloenzimas que contienen el grupo hemo, como las catalasas (Becana & Rodríguez - Barrueco, 1989). Además, algunas especies de rizobios, han desarrollado la capacidad de aprovechar la energía liberada por la oxidación del H_2 que se produce durante la reacción de fijación del nitrógeno (Ruíz-Argüeso et al., 1979, Emerich et al., 1979). Esto es debido a la acción de la hidrogenasa, enzima que presenta grupos Fe-S donadores de electrones y un complejo metálico con níquel y hierro

en su centro activo (Przybyla et al., 1992). Esta gran variedad de metaloproteínas y en las altas concentraciones en las que se requieren, hacen que el nódulo sea uno de los principales órganos sumideros de la planta.

El hecho de que plantas noduladas muestren una mayor demanda de metales, se evidencia porque la baja biodisponibilidad de estos nutrientes limita el desarrollo de los nódulos (Tang et al., 1991, Tang et al., 1992). Por ello, estas plantas inducen sus sistemas de respuestas de deficiencia de metal, para asegurar un suministro adecuado de metales al nódulo (Terry et al., 1991). La inducción de este tipo de respuestas en la planta indica que los metales que la bacteria necesita para la fijación de nitrógeno son proporcionados por la planta huésped, en lugar de usar cualquier reservorio de metal rizobiano (González-Guerrero et al., 2016). Estudios recientes por S-XRF ("Synchrotron-based X-Ray Fluorescence") sobre la distribución de metales en nódulos indeterminados de *M. truncatula*, han demostrado que el hierro, y presumiblemente otros metales, llegan a través del cilindro vascular (xilema) hasta la zona de infección del nódulo (Zona II), donde son liberados al apoplasto (Rodríguez-Haas et al., 2013) (Figura 3A). Ésta es la zona donde se establece la simbiosis y donde comienza la diferenciación del rizobio a bacteroide.

Los metales en el xilema, debido a su pH ácido, se encuentran formando complejos con compuestos orgánicos, para evitar que precipiten (Figura 3A). También en otros fluidos vegetales (citoplasma, apoplasto, etc), los metales se encuentran unidos a moléculas orgánicas para evitar que formen especies reactivas de oxígeno y radicales libres que pueden dañar los componentes celulares y causar estrés oxidativo. Estos compuestos orgánicos pueden ser carboxilatos (citrato y malato), aminoácidos, como histidina o nicotianamina (NA), y sus derivados (llamados fitosideróforos (PSs), como el ácido mugínico (MA) y 2'-desoxymuginéico (DMA)), así como péptidos y proteínas (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Todas estas moléculas son capaces de unir hierro, cobre, zinc, manganeso o cadmio (Alvarez-Fernández et al., 2014). Existen evidencias de la presencia de complejos Fe^{3+} -citrato o de Cu^{2+} -NA en el xilema de tomate (Rellán-Álvarez et al., 2010) (Pich & Scholz, 1996), sin embargo, el zinc no está claro cómo se encuentra en el xilema, siendo histidina, citrato o malato posibles candidatos (Figura 3B) (White et al., 1981, Alvarez-Fernández et al., 2014, Flis et al., 2016).

Desde que los metales llegan por los vasos del nódulo, hasta que éstos alcanzan los bacteroides, deben atravesar varias membranas. Esto lo hacen con ayuda de transportadores específicos que median el paso de estos metales entre los distintos tipos celulares del nódulo.

Existen varias familias de estos transportadores de metales, unos encargados de introducirlos en el citoplasma de las células y otros encargados de sacarlos.

2.1. Transportadores que extruyen metales del citosol

Estos transportadores median la salida de metales de transición desde el citosol de la célula al exterior celular o al lumen de distintos orgánulos, en función de su localización subcelular específica. Esto confiere a estos transportadores de distintas funciones fisiológicas, como son la extrusión de metales al apoplasto para contribuir a su reparto a distintos tejidos, a proporcionar metales a metaloproteínas sintetizadas en los distintos orgánulos, o a la detoxificación de metales cuando llegan a niveles tóxicos. Dentro de estas familias de transportadores, las más estudiadas han sido las P_{1B}-ATPasas, los CDF, las ferroportinas y las VIT/CCC1:

- P_{1B}-ATPasas: La subfamilia de las P_{1b}-ATPasas, están presentes en los tres dominios de la vida. (Argüello et al., 2012, Abdel-Ghany et al., 2005, Morel et al., 2009). Las P_{1B}-ATPasas son monómeros formados por entre 6-8 dominios transmembrana. Los dos últimos bucles citoplasmáticos de mayor tamaño y más próximos al extremo C-terminal, contienen el dominio ATPasa, que impulsa el transporte y alberga el dominio activador (Argüello et al., 2007). Las tres hélices transmembrana más cercanas al dominio C-terminal, contienen aminoácidos específicos que determinan la afinidad por los distintos metales y hace que las P_{1b}-ATPasas puedan dividirse en 7 subclados: P_{1B-1} para Cu⁺ y Ag⁺; P_{1B-2} para Zn²⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺; P_{1B-3} para Cu²⁺; P_{1B-4} para Co²⁺, Cd²⁺ y Zn²⁺; P_{1B-5} para Fe²⁺ y Ni²⁺; P_{1B-6} y P_{1B-7}, cuyo sustrato aún es desconocido (Argüello et al., 2012, Zielazinski et al., 2013, Smith et al., 2014, Smith et al., 2017). Además de los sitios de unión al metal de los dominios transmembrana, estos transportadores tienden a tener dominios citosólicos de unión al metal en los extremos N y C-terminal, con función reguladora (Argüello et al., 2007). Son varias las P_{1B}-ATPasas que se han descrito en plantas, donde se conocen como HMAs (heavy metal-transporting P-type ATPases). *Arabidopsis thaliana* posee 8 diferentes (Baxter et al., 2003). AtHMA2, AtHMA3, AtHMA4 están implicadas en mantener la homeostasis de zinc en la célula, y en la detoxificación de cadmio (Hussain et al., 2004, Mills et al., 2003). AtHMA2 y AtHMA4 están localizadas en la membrana plasmática y están implicadas en el transporte de Zn²⁺ a larga distancia por los vasos (Hussain et al., 2004, Cun et al., 2014). Por otro lado, AtHMA3 está localizada en la vacuola y sus mutantes son hipersensibles a zinc y a cadmio, por lo que su función está relacionada con la detoxificación de zinc y de otros metales no-

biológicos como el cadmio (Morel et al., 2009). El mutante *hma5* por el contrario es hipersensible a cobre por lo que, AtHMA5 estaría implicada en la compartimentalización y detoxificación de cobre (Ándrés-Colás et al., 2006). AtHMA6 (PAA1) y AtHMA8 (PAA2) están relacionadas con el transporte de cobre, y ambas tienen una función muy importante en el cloroplasto. La primera, se localiza en la membrana interna del cloroplasto, donde se encarga de introducir cobre para síntesis de cupro-proteínas del estroma (Shikanai et al., 2003). AtHMA8 se localiza en la membrana de los tilacoides, donde podría estar proporcionando el cobre necesario para la síntesis de la plastocianina (Abdel-Ghany et al., 2005).

- Transportadores CDF (en inglés: Cation Difusion Facilitator): los miembros de esta familia se encuentran en todos los organismos (Kolaj-Robin et al., 2015) y son transportadores de membrana capaces de transportar Zn^{2+} , y otros cationes divalentes como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Cd^{2+} , acoplados a un antiporte con H^{+} (MacDiarmid et al., 2002, Gupta et al., 2014, Cubillas et al., 2014, Cubillas et al., 2013, Raimunda & Elso-Berberian, 2014). La proteína funcional es un homodímero (Lu & Fu, 2007), donde cada monómero está formado por una región que contiene 6 dominios transmembrana, y el extremo citosólico C-terminal. Entre la cuarta y la quinta región transmembrana, existe un bucle citoplasmático rico en histidinas, que es característico y exclusivo de eucariotas (Kolaj-Robin et al., 2015). En la estructura del transportador, existen tres dominios de unión al metal, el sitio I en la región transmembrana, el sitio II en la interfaz membrana-citosol y el sitio III en la región C-terminal. Sin embargo, parece que sólo los sitios I y III están implicados en el transporte, concretamente, el primero, probablemente sea el que define el metal a transportar. El sitio III facilita la dimerización, por lo que podría estar involucrado en el mecanismo de regulación del transporte. Mediante análisis filogenéticos, la familia de los CDFs pueden dividirse en tres grupos principales, que coinciden con distinta especificidad de metal (Montanini et al., 2007): el primero, formado por CDFs transportadores de Mn^{2+} (Mn-CDF), el segundo incluye los CDFs que transportan $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Fe/Zn-CDF) y un tercer grupo que engloba a aquellos CDFs que transportan Zn^{2+} (Zn-CDF) y otros metales, excepto Fe^{2+} y Mn^{2+} . En bacterias, están implicados principalmente en la tolerancia/detoxificación a estos metales mediante su extrusión fuera del citosol celular. Sin embargo, en eucariotas, a parte de esta función, tienen otra función adicional como transportadores de metales intracelulares y a larga distancia (Kolaj-Robin et al., 2015). Los CDFs de plantas se

denominan MTPs (Metal Tolerance Proteins), (Ricachenevsky et al., 2013, Migocka et al., 2015). Las plantas modelo *A. thaliana* y *O. sativa* poseen 12 y 10 miembros de esta familia, respectivamente. Entre ellos se encuentran AtMTP1 y OsMTP1, ambos se localizan en la vacuola, desde donde secuestran el zinc que se encuentre en exceso en el citoplasma (Kobae et al., 2004, Desbrosses-Fonrouge et al., 2005, Menguer et al., 2013). También se han descrito transportadores MTPs que transportan manganeso, como es el caso de AtMTP8 (Eroglu et al., 2016). Éste se localiza en el tonoplasto de las células de la raíz, donde previene a la planta de la toxicidad por manganeso y facilita la adquisición de hierro de manera indirecta. También se ha encontrado en embriones y semillas, donde suponen una reserva de manganeso para la germinación (Eroglu et al., 2017). Pero no todos se encuentran en orgánulos intracelulares. Por ejemplo, CsMTP9 de pepino (*Cucumis sativus*) está localizado en la membrana plasmática de las células de la endodermis de la raíz, desde dónde saca manganeso y cadmio de estas células, para que vayan hacia el cilindro vascular de la raíz (Migocka et al., 2015). Este último caso es un claro ejemplo, de cómo los CDFs no sólo están implicados en la detoxificación de metales, sino también en el transporte de estos a larga distancia.

- Ferroportinas (FPN): estos transportadores sólo se encuentran en organismos eucariotas. (Morrissey et al., 2009, Muckenthaler et al., 2008). Estudios de predicción de su topología indican la existencia de 11 dominios transmembrana, con el extremo C- terminal hacia el citosol y con un gran bucle citoplasmático entre el dominio transmembrana 5 y 6 (Yeh et al., 2011). Como sustratos metálicos se han descrito Fe^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} , que son sacados del citoplasma celular por un mecanismo aún desconocido (Schaaf et al., 2006, Muckenthaler et al., 2008, Morrissey et al., 2009). En mamíferos, la ferroportina (FPN1) es el único transportador que se ha descrito hasta la fecha, capaz de sacar hierro al torrente sanguíneo desde los enterocitos del duodeno (Muckenthaler et al., 2008, Yeh et al., 2011). En plantas se han estudiados dos ortólogos de este gen en *A. thaliana*, AtIREG1/FPN1 y AtIREG2/FPN2 (Schaaf et al., 2006, Morrissey et al., 2009). El primero transporta hierro y cobalto hacia la parte aérea, por lo que parece estar asociado a la extrusión de estos metales hacia el xilema (Morrissey et al., 2009). El segundo es un transportador localizado en el tonoplasto, que se expresa en raíces bajo deficiencia de hierro, y está asociado a la detoxificación de níquel en estas circunstancias (Schaaf et al., 2006). Es frecuente que en condiciones de deficiencia de hierro otros metales tóxicos como el níquel entren a la planta

mediante transportadores que se inducen para paliar esa deficiencia de hierro (Agarwala et al., 1977, Schaaf et al., 2006). Transportadores como AtIREG2/FPN2 tendrían como función la detoxificación de esos metales tóxicos mediante el secuestro de los mismos en la vacuola. Se ha descrito un papel similar para el transportador CDF AtMTP3, que se regula con hierro, se localiza en el tonoplasto y se cree que secuestra el zinc en la vacuola en deficiencia de hierro (Arrivault et al., 2006).

- Transportadores VIT1/CCC1: se conoce muy poco a cerca de su estructura y su mecanismo de transporte. Programas de análisis de estructuras secundarias de proteínas, predicen que es posible que tengan 5 dominios transmembrana (Kim et al., 2006). Los mejores estudiados son ScCCC1 en levaduras y su ortólogo en *Arabidopsis* AtVIT1. Ambos están relacionados con el mantenimiento de las reservas intracelulares de hierro y manganeso en la vacuola (Li et al., 2001, Kim et al., 2006). En concreto, AtVIT1 tiene una elevada expresión en las semillas, donde tiene un papel en la homeostasis de hierro. Las semillas *vit1-1* presentan alterada la distribución de hierro respecto de las semillas silvestres, haciendo que éste sea menos accesible para la germinación (Kim et al., 2006).

2.2. TRANSPORTADORES QUE INTRODUCEN METALES EN EL CITOSOL.

Los transportadores encargados de introducir metales en el citosol juegan un papel clave en la entrada de estos en el interior de la célula y en la removilización de las reservas acumuladas en orgánulos (Hall & Williams, 2003, Krämer et al., 2007). Las familias de transportadores que introducen metales, más estudiadas son los ZIP, la familia Nramp, los Ctr/COPT, los MOT1 y los OPT:

- Transportadores ZIP: esta familia toma el nombre de los primeros miembros identificados: los Zrt1 (zinc regulated transporter1 de *S. cerevisiae*) Irt1 (iron regulated transporter1 de *Arabidopsis*)- Protein (Guerinot, 2000). Aunque en un inicio se pensó que estaban presentes sólo en eucariotas (Eng et al., 1998), actualmente se sabe que también, bacterias y arqueas tienen transportadores tipo ZIP (Gaither & Eide, 2001). Éstos son capaces de introducir en el citosol de la célula principalmente Zn^{2+} y Fe^{2+} , aunque también Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} (Eide et al., 1996, Grotz et al., 1998, Mizuno et al., 2005, Korshunova et al., 1999, Milner et al., 2013, Socha & Guerinot, 2014), mediante un mecanismo de transporte aún desconocido. Mientras que unos autores hablan de un simporte con HCO_3^-

(Gaither & Eide, 2000, Liu et al., 2008), otros sugieren que podrían funcionar como canales selectivos (Lin et al., 2010). Aunque no se conoce la estructura proteica de ninguno de los transportadores ZIPs descritos, análisis computacionales han mostrado que estarían formados por 8 hélices transmembrana formando un homodímero (Guerinot, 2000, Antala et al., 2015). Cada monómero tiene los extremos amino y carboxi-terminal fuera de la célula y un largo bucle citoplasmático, rico en histidinas, entre los dominios transmembrana 3 y 4, que parece facilitar la unión del metal (Gaither & Eide, 2001). Muchos han sido los transportadores ZIPs que se han descrito en diferentes especies de plantas (Guerinot, 2000). *Arabidopsis* tiene 18 transportadores tipo ZIP (Gaither & Eide, 2001), entre los que se encuentra, AtIRT1. Este transportador está localizado en las células de la epidermis de la raíz, desde donde transporta Fe^{2+} hacia el interior en la planta. También es capaz de transportar Mn^{2+} , Zn^{2+} y posiblemente Co^{2+} y Cd^{2+} (Korshunova et al., 1999). AtIRT1 y sus ortólogos, son esenciales para la entrada de Fe^{2+} en las plantas que siguen la estrategia I de incorporación de hierro (Kobayashi & Nishizawa, 2012). Esta estrategia llevada a cabo por todas las dicotiledóneas y alguna monocotiledóneas, incluyen un paso previo de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} catalizado por ferredoxinas (FRO) (Jeong et al., 2017). Un estudio previo mostró que, en *M. truncatula* existen hasta 7 miembros de la familia ZIP. Mediante ensayos de complementación de levaduras mutantes en el transporte de hierro, zinc y manganeso, se descubrió que, MtZIP1, MtZIP5 y MtZIP6 son capaces de transportar Zn^{2+} ; MtZIP4 y MtZIP7 pueden transportar Mn^{2+} y por último, que, MtZIP3, MtZIP5 y MtZIP6 transportan Fe^{2+} (López-Millán et al., 2004). Un mayor conocimiento del genoma de *M. truncatula*, ha permitido, posteriormente identificar hasta 10 ZIPs más, siendo un total de 17 los miembros de esta familia en esta leguminosa modelo (Abreu et al., 2017).

- Transportadores NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein): se encuentran una gran variedad de organismos, desde en bacterias, hasta en humanos (Nevo & Nelson, 2006). La familia toma el nombre del primer Nramp descubierto en ratón, que se localiza en la membrana fagosomal de los macrófagos, y era capaz conferir resistencia a la infección por micobacterias (Nevo & Nelson, 2006). Transportan una amplia variedad de metales, Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} , hacia el interior del citoplasma celular, mediante un co-transporte con H^+ (Gunshin et al., 1997, Nevo & Nelson, 2006, Ehrnstorfer et al., 2017). Funcionan como monómeros formados por 11 dominios transmembrana. Los sitios de unión al metal, los forman cuatro aminoácidos, una metionina y una alanina del

dominio 6 y un aspártico y una asparagina en el dominio transmembrana 1 (Ehrnstorfer et al., 2014). Transportadores de esta familia se han identificado en muchas especies de plantas, de la que *A. thaliana* posee 6 miembros (Curie et al., 2000, Cailliatte et al., 2009, Thomine et al., 2003). AtNramp3 y AtNramp4, se localizan en el tonoplasto del embrión, donde median la movilización de hierro desde sus reservas en la vacuola para las primeras etapas del desarrollo de la planta (Lanquar et al., 2005). Otros Nramp están implicados en la entrada del metal directamente desde el suelo, como es el caso de AtNramp1, localizado en la epidermis de la raíz y responsable de la entrada de Mn^{2+} (Cailliatte et al., 2010).

- Transportadores CTR/COPT: Están presentes sólo en eucariotas, y se conocen como COPT en plantas (Sancenón et al., 2003) y como CTR en animales y hongos (Kim et al., 2013). Funcionan como homotrómeros o heterotrómeros, que forman un canal específico para el transporte de Cu^{+} , donde cada monómero está formado por 3 dominios transmembrana (Eisses et al., 2005, Zhou & Thiele, 2001, Aller & Unger, 2006, Nose et al., 2006). El extremo N-terminal del exterior celular, tiene un dominio conservado rico en metioninas, que están dispuestas como motivos MxxM y MxM (Dancis et al., 1994, Zhou & Thiele, 2001) y también hay dominios metionina-glicina ($Mx_3Mx_{12}Gx_3G$) dentro de las regiones transmembrana 2 y 3, que podrían estar implicados en la unión a cobre (Puig et al., 2002, Nose et al., 2006, Aller et al., 2004). El extremo C-terminal que está orientado hacia el citoplasma, contiene motivos cisteína (CxC) bien conservados, en los que se sugiere que se une el cobre para ser transferido a las chaperonas de cobre citosólicas. (Puig & Thiele, 2002, Xiao & Wedd, 2002). En plantas, la familia CTR/COPT está representada por 6 miembros en *Arabidopsis* (AtCOPT1-6) (Peñarrubia et al., 2010) y por 7 miembros en arroz (OsCOPT1-7) (Yuan et al., 2011). AtCOPT1 fue uno de los primeros en ser identificados y caracterizados en plantas (Sancenón et al., 2004, Kampfenkel et al., 1995). Se localiza en los extremos de la raíces principales y secundarias, donde su función está relacionada con la absorción de cobre directamente desde el suelo, cuando éste es limitante para el crecimiento de la planta.

- Transportadores MOT1 (Molybdate transporter type 1): esta familia de transportadores fue identificada de forma paralela en *Chlamydomonas reinhardtii* y en *A. thaliana* (Tejada-Jiménez et al., 2007, Tomatsu et al., 2007). A diferencia de otros metales, el molibdeno se transporta en forma de oxoanión molibdato. Los MOT1 descritos en *C.*

reinhardtii y *A. thaliana* son transportadores de alta afinidad para molibdato, aunque su función en plantas superiores no está clara aún, ya que mientras que unos autores sugieren un papel en la captación de molibdato desde el suelo (Tomatsu et al., 2007), otros apuntan a una función en la homeostasis de molibdeno mitocondrial (Baxter et al., 2008).

- Transportadores OPT (oligopeptide transporter) y YSLs (Yellow Stripe-like): desde el punto de vista filogenético, los YSL, pertenecen a la familia OPT (Yen et al., 2001, Lubkowitz, 2011). Estos últimos se han encontrado en procariotas, hongos y plantas, sin embargo, los YSL se han descrito únicamente en plantas (Curie et al., 2009). En ambos casos se trata de proteínas que transportan sus sustratos desde el exterior celular o un orgánulo, hacia el citosol. Se han identificado tres categorías de sustratos para esta familia: péptidos pequeños, glutatión y aminoácidos secundarios formando complejos con metales (Lubkowitz, 2011). Las funciones de los OPT están menos definidas. Algunos se han asociado con el transporte de metales, aunque se desconoce el complejo metálico que transportan (Lubkowitz, 2011, Zhai et al., 2014, Bashir et al., 2015). Los YSLs deben su nombre al fenotipo identificado en el primer mutante descrito en maíz (*ys-1*), el cual presentaba hojas con clorosis intervenal (líneas amarillas). Esta clorosis era causada por una deficiencia en la absorción de hierro, provocada por una mutación en *ZmYS1*, un transportador de la epidermis de la raíz (Beadle, 1929, Curie et al., 2001). Desde el descubrimiento de este mutante, se han identificado otros YSLs involucrados en la homeostasis de metales en planta, interviniendo en la translocación de cationes metálicos que forman complejos con nicotianamina (NA) o sus derivados como el ácido 2'-deoximugineico (DMA) (Curie et al., 2009, Lubkowitz, 2011, Conte & Walker, 2012). La NA es un aminoácido no-proteinogénico que se encuentra a menudo implicado en el transporte de metales a larga distancia en plantas y forma complejos estables con Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , en orden creciente de afinidad (Anderegg & Ripperger, 1989). El transporte de estos quelatos metálicos se lleva a cabo por los YSLs mediante un simporte con H^+ (Schaaf et al., 2004). No se sabe mucho sobre la estructura de estas proteínas, aunque programas de predicción de dominios transmembrana pronostican que podrían tener entre 11 y 16. Los transportadores YSL en plantas tienen dos funciones diferenciadas, por un lado, están implicados en la absorción de metales directamente desde el suelo, en el caso de monocotiledóneas (Estrategia II) y por otro, intervienen en el transporte a larga distancia de estos metales en plantas mono y dicotiledóneas (Lubkowitz, 2011, Conte & Walker, 2012). Relacionados con

la primera función se han descrito varios transportadores de metales en cereales: ZmYS1 en maíz (Curie et al., 2001), HvYS1 en cebada (Murata et al., 2006, Ueno et al., 2009) o OsYSL15 en arroz (Inoue et al., 2009, Lee et al., 2009). Todos ellos se expresan en condiciones de deficiencia de hierro y se localizan en la epidermis de la raíz, desde donde introducen Fe^{3+} -DMA (Conte & Walker, 2012). Algunos de ellos, como es el caso de ZmYS1 y OsYSL15, no sólo intervienen en la entrada de hierro en la planta, sino también en su distribución dentro de ella, expresándose también, por ejemplo, en hojas. Otros YSLs relacionados con el transporte a larga distancia que se han descrito son: OsYSL2 de arroz, que se localiza en el floema donde es capaz de transportar Fe^{2+} -NA y Mn^{2+} -NA (Koike et al., 2004); AtYSL2 de *A. thaliana*, que se localiza en el periciclo de la raíz y es capaz de transportar Fe^{2+} -NA y Cu^{2+} -NA (DiDonato et al., 2004, Schaaf et al., 2005) o AtYSL1, que se expresa en el parénquima del xilema de hojas, en el polen y en los frutos y es capaz de transportar Fe^{2+} -NA (Waters et al., 2006, Chu et al., 2010).

2.3. Transporte de metales en el nódulo.

Los metales formando complejos con moléculas orgánicas, llegan al nódulo a través del xilema. Dado que el hierro se ha encontrado en el xilema formando complejos con citrato y el cobre con NA, es posible que lleguen al nódulo unidos a estas moléculas (Figura 3A) (Rellán-Álvarez et al., 2010). Una vez llegan a la zona de infección estos serán liberados al apoplasto del nódulo (Rodríguez-Haas et al., 2013) mediante una serie de transportadores específicos. Todo este proceso de transporte requiere el paso a través de varias membranas desde el periciclo de los vasos en los nódulos a la membrana interna de los rizobios que colonizan las células de los nódulos (Figura 3B).

Figura 3: Transporte de metales en el nódulo. (A) Transporte de metales desde la raíz hasta el nódulo. (B) Representa con más detalle la zona del cuadro de la Figura 3A. Transportadores implicados en llevar los metales desde los vasos hacia los bacteroides

Al igual que ocurre con el transporte de hierro desde las raíces a los tallos (Rogers & Guerinot, 2002, Durrett et al., 2007), el citrato también parece jugar un importante papel en la llegada de este nutriente a los nódulos fijadores de nitrógeno. Esto está avalado por el fenotipo de mutantes en el gen *LjMATE1* en *L. japonicus* (Takanashi et al., 2013). Éste es un transportador específico de nódulo que cuando se muta produce una acumulación de hierro en los vasos en la zona de unión entre la raíz y el nódulo. Debido a esto, no llega suficiente hierro a los bacteroides, lo que provoca una disminución de la actividad nitrogenasa.

No es citrato el único quelante que parece jugar un papel en la homeostasis de metales en los nódulos. La NA parece tener un importante papel en la especiación del metal en el nódulo, ya que mutaciones en una nicotianamina sintasa (NAS) en el nódulo de *M. truncatula*, se traducen en un descenso de la actividad nitrogenasa en el mutante (Avenhaus et al., 2016). Se desconoce en qué punto del transporte de estos metales, la NA estaría jugando un papel crucial para la fijación de nitrógeno. Existen 3 posibilidades, que intervenga en la entrega de complejos metal-NA al nódulo, que sea un quelante intracelular para evitar la toxicidad de estos metales dentro de la célula, o que actúen de donadores de metal a otros transportadores clave para la fijación de nitrógeno (González-Guerrero et al., 2016). Sin embargo, no se ha descrito aún ningún transportador YSL que pudiera desempeñar alguna de estas funciones en nódulo, pese a que cabría esperar su presencia, dado ya se han descrito YSL en otros sumideros, como las hojas, con este papel (Koike et al., 2004, Waters et al., 2006). Éste es el caso de, AtYSL1 y AtYSL3 de *A. thaliana* que están localizados en el parénquima xilemático, y su mutación causa clorosis intervenal, debido a que complejos hierro-NA no son capaces de salir del xilema hacia el mesófilo de la hoja (Waters et al., 2006).

Para liberar los metales al apoplasto de la zona II del nódulo, en la endodermis de los vasos, deben existir transportadores tipo P_{1b} -ATPasa, FPN o CDF, que tendrían como función sacar esos metales completamente del cilindro vascular y liberarlos al apoplasto. Allí formarían complejos con citrato o NA, y mediante transportadores específicos podrían ser incorporados por la célula. Los transportadores MtCOPT1, MtMOT1.3, y MtZIP6 mediarían el transporte de alguno de estos nutrientes (Senovilla et al., 2017, Tejada-Jiménez et al., 2017, Abreu et al., 2017). MtCOPT1 es específico de nódulo y se localiza en la membrana plasmática de las células de la zona de infección, donde es capaz de introducir Cu^{+} . En mutantes *copt1-1*, la disminución en la entrada de Cu^{+} hacia los bacteroides, provoca una disminución de actividad nitrogenasa respecto a las plantas de tipo silvestre, que es debida a un descenso en la actividad citocromo oxidasa tipo-*cbb3* de la bacteria (Senovilla et al., 2017). MtMOT1.3 es un transportador de

molibdato cuya expresión es también específica de nódulo (Tejada-Jiménez et al 2017). Se localiza en la membrana plasmática de células infectadas y no infectadas, de la zona de fijación del nódulo. Los mutantes *mot1.3-1* presentan una disminución de actividad nitrogenasa respecto a las plantas silvestres, debido a la falta de este aporte de MoO_4^{2-} en las células donde se está llevando a cabo la FSN. Por último, MtZIP6, un transportador de la familia ZIP con alta expresión en nódulos, parece ser el responsable de la captación de zinc por parte de las células infectadas de la zona de infección del nódulo (Abreu et al., 2017), ya que se encuentra localizado específicamente en la membrana plasmática de las mismas. Las plantas que tienen silenciado este gen mediante RNAi, muestran una menor capacidad de fijar nitrógeno que las plantas control. Así mismo, al silenciar MtZIP6 se produce una acumulación de zinc en el apoplasto de la zona de infección del nódulo. Por ello, parece que MtZIP6 es esencial para el suministro de Zn^{2+} a las células infectadas.

Sin embargo, previo a esta tesis doctoral no existe un candidato claro para mediar la entrada de hierro en las células infectadas con rizobios. A priori, MtZIP6 podría realizar esta función, dado que cuando se expresa en levadura es capaz de complementar fenotipos basados en defectos en la entrada de hierro en la célula (López-Millán et al., 2004). De hecho, varios transportadores ZIP, como IRT1 son capaces de transportar Fe^{2+} así como Zn^{2+} (Korshunova et al., 1999). Sin embargo, los niveles de hierro no estaban alterados en las plantas silenciadas en *MtZIP6*, y no existen ninguna evidencia experimental que indique que *in vivo* pueda transportar hierro. De este modo, cabría esperar la existencia de otro transportador ZIP, o Nramp, o YSL que mediara la incorporación de hierro en las células infectadas con rizobios.

Tras ser introducidos en las células infectadas por rizobios, los metales deben destinarse a los orgánulos típicos de una célula vegetal (Hall & Williams, 2003), y en el caso de estas células, también a los simbiosomas. Estudios del proteoma de la membrana del simbiosoma de *G. max*, han mostrado algunos transportadores de metales, como GmDMT1 (Kaiser et al., 2003) y GmZIP (Moreau et al., 2002) (Figura 3B). En ambos casos, inicialmente se propusieron como buenos candidatos para introducir hierro y zinc, respectivamente, en los bacteroides. GmDMT1 es un transportador de la familia Nramp capaz de complementar el fenotipo de la levadura mutante en la adquisición de hierro, *fet3fet4*. De ahí se traduce que GmDMT1 es capaz de introducir Fe^{2+} en el citosol celular. El segundo, GmZIP1, pertenece a la familia ZIP y es capaz de transportar Zn^{2+} , dado que complementa el fenotipo de la levadura mutante *zrt1/zrt2*. Dada la localización de ambos transportadores y la dirección de transporte observada en levaduras, GmDMT1 y

GmZIP1 no estarían involucrados en proporcionar Fe^{2+} y Zn^{2+} a los bacteroides, sino que estarían sacando ambos metales del espacio peribacteroidal. De este modo, es posible que el papel de GmDMT1 y GmZIP1 *in planta* sea el de mantener la homeostasis de hierro y zinc dentro del espacio peribacteroidal, evitando la acumulación de estos metales a concentraciones tóxicas. Sin embargo, los autores, como solución a este dilema, hipotetizan un transporte bidireccional de ambos transportadores, aunque esto no se ha demostrado bioquímicamente (Moreau et al., 2002, Kaiser et al., 2003). Más recientemente se ha descubierto el transportador LjSEN1, perteneciente a la familia VIT1/CCC1 (Hakoyama et al., 2012). Es específico de nódulo, y se expresa en células infectadas. Aunque se desconoce su localización subcelular, se sabe que transporta hierro. Mutantes *ljsen1* presentan nódulos completamente inactivos, incapaces de fijar nitrógeno. Por tanto, este LjSEN1 sería un buen candidato para proporcionar hierro al simbiosoma, sacándolo de la célula vegetal infectada. Este gen se ha descrito en *L. japonicus*, pero también se ha detectado en otras leguminosas como *M. truncatula* o *P. sativum* (Hakoyama et al., 2012). En esta entrada de hierro, parece que el citrato jugaría un importante papel, dado que existe evidencia de que los rizobios prefieren el complejo hierro-citrato como la principal fuente de hierro en la célula (Guerinot et al., 1990). Para que esto fuera posible, se esperaría que algún transportador tipo MATE, estuviera localizado en la membrana simbiosomal, introduciendo citrato en el espacio peribacteroidal (Figura 3B). El resto de metales, podrían estar atravesando la membrana del simbiosoma a través de transportadores como P_{1b} -ATPasas (para cobre o zinc), o MTPs (para zinc), cuya función sería sacar metales del citosol. Sin embargo, en algunos de los últimos análisis de transcriptómica realizados, no se han encontrado inducidas ninguna P_{1b} -ATPasa en el nódulo (Benedito et al., 2008, Roux et al., 2014).

Una vez que los metales atraviesan la membrana del simbiosoma, éstos se acumulan en el espacio peribacteroidal (LeVier et al., 1996). Una vez allí, deben atravesar las dos membranas del rizobio. Poco se sabe acerca de cuáles son los transportadores de metales de ambas membranas de la bacteria cuando ésta se encuentra en simbiosis. Recientemente se ha descubierto en *B. japonicum* un transportador de Fe^{2+} , llamado FeoAB que se localiza en la membrana interna del bacteroide (Sankari & O'Brian, 2016). FeoAB se expresa tanto en vida libre como en simbiosis con soja, donde tiene una función clave para la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno, ya que bacterias mutantes *feoA* y *feoB*, dan lugar a nódulos pequeños e inactivos, que contienen unas pocas bacterias incapaces de fijar nitrógeno (Sankari & O'Brian, 2016). También se ha identificado un sistema de transporte tipo ModABC (Delgado et al., 2006)

en la membrana interna de *B. japonicum*, que se expresa tanto en bacterias de vida libre, como en simbiosomas y que podría ser el responsable del aporte de molibdato necesario para la síntesis de nitrogenasa. Para el transporte de zinc hacia el interior del bacteroide se ha propuesto un sistema Znu codificado por el operón *znuABC* en varios géneros de bacterias, entre los que se encuentran *S. meliloti* (Vahling-Armstrong et al., 2012). El mutante de *znuA* en *S. fredii* forma una gran cantidad de nódulos, pero todos ellos inactivos, resultado de una baja incorporación de zinc en el rizobio (Jiao et al., 2016).

También se han identificado sistemas de secreción de metales localizados en la membrana interna del bacteroide que median la salida de éstos hacia el espacio periplásmico. Todos ellos tienen la importante función de evitar la toxicidad de metales en el interior de la bacteria y la de proporcionar metales para las proteínas periplásmicas. Se han identificado varias P-ATPasas, en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti*, una de ellas es CopA1 que saca Cu^+ y Nia1 capaz de sacar Fe^{2+} y Ni^{2+} al espacio periplásmico (Zielazinski et al., 2013, Patel et al., 2014). Estos sistemas no son críticos para la fijación simbiótica del nitrógeno, aunque, se expresan en condiciones simbióticas y confieren la tolerancia al metal cuando se encuentran en condiciones de vida libre. Existe otra Cu^+ -ATPasa, CopA2 o también conocida como FixI, que se transcribe junto con una citocromo oxidasa *cbb3* a la que proporciona el cobre necesario para ensamblaje de esta enzima (Preisig et al., 1996a). Además, un tercer tipo de este tipo de P-ATPasas es CopA3, la cual parece ser responsable de proporcionar el cobre a algunas de las cuproenzimas implicadas en la respuesta inmune que la planta hospedadora experimenta en los primeros pasos del proceso de nodulación (Patel et al., 2014).

OBJETIVOS

Los metales de transición tienen una baja biodisponibilidad en gran parte de los suelos agrícolas, siendo limitantes para las plantas. Para las leguminosas, estos metales son aún más limitantes, al tener una gran demanda adicional, para formar el nódulo y llevar a cabo la FSN. Como se ha indicado en la introducción, se tiene muy poca información acerca de cómo estos nutrientes son entregados desde la planta al bacteroide. Un mayor conocimiento de los sistemas de transporte y la homeostasis de metales en la simbiosis rizobio-leguminosa, permitiría poder regular y optimizar la fijación de nitrógeno, para poder alcanzar mayores rendimientos en el nitrógeno fijado simbióticamente.

En estudios de transcriptómica previos a la realización de esta Tesis Doctoral, se identificaron tres genes de la leguminosa modelo *M. truncatula* regulados positivamente por la nodulación: MtNramp1, MtYSL1, y MtYSL8. Estos genes podrían estar implicados en el transporte de metales de transición a los nódulos.

Con la intención de determinar el papel de estos genes en la homeostasis de metales en la simbiosis rizobio-leguminosa, se fijaron los siguientes objetivos:

1. Determinación del patrón de expresión de los transportadores MtNramp1, MtYSL1, y MtYSL8 de *M. truncatula*.
2. Caracterización de la localización tisular y subcelular de cada uno de los transportadores.
3. Identificación de los sustratos a transportar por cada uno de los transportadores objeto de estudio.
4. Evaluación del papel que podrían estar jugando estos transportadores de metales en la FSN en condiciones simbióticas, y en la homeostasis de metales general de la planta en condiciones no simbióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

1.1. *Medicago truncatula*.

El ecotipo R108 de *M. truncatula* fue el usado para todos los experimentos de simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*. Las semillas se escarificaron con 95 % (v/v) H_2SO_4 durante 7,5 minutos, y se lavaron con agua 8 veces. Posteriormente se esterilizaron con 25 mg/ml de NaClO durante 90 segundos, y se lavó 6 veces con agua estéril. Las semillas se embebieron en agua estéril durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se depositaron en placas de 0,8 % agar en agua y se estratificaron en oscuridad 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, y se crecieron en invernadero, en condiciones de 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Las plantas fueron regadas 3 veces por semana con agua. Para los experimentos de simbiosis, las plántulas pre-germinadas, se transplantaron a macetas de perlita estéril y se inocularon con 2 ml de un cultivo saturado de *S. meliloti* 2011. El inóculo se creció previamente durante 16 horas a 28 °C en TY (composición en apartado 2.3.1.). Una vez crecidos, se sedimentaron a 5000 rpm y se resuspendieron en agua. Las plantas inoculadas se crecieron en invernadero (con 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C) y se regaron 3 veces por semana con agua o solución Jenner (composición en apartado 2.1.2.) en días alternos. Para el control de plantas sin inocular, se sustituyó el inóculo con *S. meliloti*, por riegos con 2 mM NH_4NO_3 cada dos semanas.

1.2. *Arabidopsis thaliana*

Para los ensayos de *A. thaliana* se usó el ecotipo Col-0. Para la propagación de semillas y experimentos en sustrato, se usó turba:vermiculita (3:1). Tras sembrar las semillas en este suelo, se estratificaron 2 días a 4 °C en oscuridad. El crecimiento se realizó en cámaras de cultivo bajo 16 horas de fotoperiodo (ciclo largo), una temperatura de entre 20-22 °C y una humedad relativa de entre el 65-70 %. Para los cultivos in vitro, las semillas se esterilizaron con NaClO (50 mg/ml) y 100 % etanol en proporción 1:1 durante 8 minutos. Pasado este tiempo, se retiró la anterior solución y se sustituyó por 80 % etanol durante otros 8 min. Por último, se añadió 100 % etanol durante 8 minutos más. Las semillas se secaron en papel de filtro estéril durante al menos 10 minutos. Una vez secas, se sembraron en placas de MS al 0,8 % de agar y se estratificaron 4 días a 4 °C en oscuridad. Las placas se crecieron con 16 horas de fotoperiodo y una temperatura constante de 22 °C.

1.3. *Nicotiana benthamiana*.

Las semillas de *N. benthamiana* se pre-germinaron en turba durante 10-15 días en cámara de cultivo a 20-22 °C con 16 horas de fotoperiodo. Posteriormente se transplantaron a turba:vermiculita (3:1) y se crecieron durante 3-4 semanas en invernadero con 16 horas de fotoperiodo y una temperatura de 18-25 °C.

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura usadas en esta Tesis Doctoral están recogidas en la Tabla 1. Estas levaduras se crecieron en medio YPD (Sherman et al., 1981) o en el medio selectivo SD (Sherman et al., 1981) suplementado con los aminoácidos y las bases nitrogenadas requeridas según las auxotrofías de cada cepa. Se incubaron durante 3-5 días a 28 °C. La composición de estos medios se detalla en apartado 2.2.

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* usadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa	Genotipo	Gen mutado	Fenotipo	Origen
DEY1451	<i>MATa ade2/+ can1 his3 leu2 trp1 ura3</i>	-	-	(Dix et al., 1994)
DEY1453	<i>MATa ade2/+ can1 his3 leu2 trp1 ura3 fet3-2::HIS3 fet4-1::LEU2</i>	<i>fet3 fet4</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de hierro	(Eide et al., 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>zrt1 zrt2</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de zinc	(Zhao & Eide, 1996a, Zhao & Eide, 1996b)
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3</i>	-	-	Thermo Scientific
BY4742Δsmf1	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3 Δsmf1</i>	<i>smf1</i>	Supresión de crecimiento a alta concentración de manganeso	Thermo Scientific
DY4741Δctr1	<i>MATa, his3 leu2 met15 ura3 ctr1::ura3</i>	<i>ctr1</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de cobre, no realiza respiración aerobia	Thermo Scientific
ABC733 (BY4741)	<i>MATa, his3 leu2 met15 ura3</i>	-	-	(Brachmann et al., 1998)

ABC817 $\Delta met15 \Delta hgt1$	<i>MATa, his3 leu2 met15 ura3 hgt1::LEU2</i>	<i>hgt1</i>	Supresión de crecimiento en baja concentración de azufre.	(Bourbouloux et al., 2000)
BY4742 Y11213 $\Delta opt1 \Delta$	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 YJL212c::kanMX4</i>	<i>opt1 hgt1</i>	Supresión del crecimiento en baja concentración de nitrógeno	EURO-SCARF

1.5. *Sinorhizobium meliloti*

Las cepas utilizadas en esta Tesis Doctoral se recogen en la Tabla 2. Las cepas se crecieron en medio TY (Beringer, 1974) o medio YMB (Vincent, 1970) suplementado con los antibióticos correspondientes a una temperatura de 28 °C durante 48 horas. La composición de los medios de cultivo se detalla en los apartados 2.3.2 y 2.3.2.

Tabla 2. Cepas de *S. meliloti* usadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa	Plásmido	Resistencia ($\mu\text{g/ml}$)	Genotipo	Origen
<i>S. meliloti</i> 2011	-	Estreptomicina 200 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de SU47	(Lerouge et al., 1990)
<i>S. meliloti</i> 2011	pCH60	Estreptomicina 200 Tetraciclina 10 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S. Meliloti</i> 2011	(Cheng & Walker, 1998)

1.6. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* usadas en esta Tesis Doctoral se detallan a continuación. Todas ellas se crecieron en LB (Bertani, 1951) con los antibióticos necesarios según el plásmido usado, y a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Tabla 3. Cepas de *E. coli* usadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa	Genotipo	Selección	Origen
DH5 α	F– $\Phi 80/lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>	interrupción de lacZ usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal).	(Hanahan, 1983)
DB3	F– <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB–, mB–) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ– leu mtl1.</i>	Resistencia a la toxicidad del gen <i>cddB</i>	(Bernard & Couturier, 1992)

1.7. *Agrobacterium rhizogenes*

La cepa *A. rhizogenes* ARqua1, usada en este trabajo, deriva de la cepa A4T (Boisson-Dernier et al., 2001) y su genotipo es pRiA4-Onc⁺ Str^R. Se creció en LB (Bertani, 1951), con los antibióticos apropiados y a 28°C durante 48 horas.

1.8. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* C58C1 usada en este trabajo (Deblaere et al., 1985) se creció en LB (Bertani, 1951), con los antibióticos apropiados y se incubó a 28 °C durante 48 horas.

Las cepas de microorganismos descritas en los apartados 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 y 1.8 se cultivaron hasta alcanzar fase estacionaria y parte de ese cultivo se usó para conservarlas en 20 % glicerol estéril a -80 °C.

2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE RIEGO.

2.1. Medios y soluciones de riego para el cultivo de plantas.

2.1.1. Medio Fahreaus

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

0,01 % (p/v) CaCl₂·2H₂O

0,012 % (p/v) MgSO₄·7H₂O

0,01 % (p/v) KH₂PO₄

0,015 % (p/v) Na₂HPO₄

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

0,001 % (v/v) Mix micronutrientes

2 % (p/v) Agar bacteriológico

Solución ajustada a pH 6.5

Mix micronutrientes: 0,203 % (p/v) MnSO₄·7H₂O; 0,022 % (p/v) ZnSO₄·7H₂O; 0,008 % (p/v) CuSO₄·5H₂O; 0,01075 % (p/v) Na₂MoO₄·H₂O; 0,057 % (p/v) H₃BO₃.

2.1.2. Solución Jenner.

Esta solución se empleó para regar las plantas de *M. truncatula* cultivadas en invernadero 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) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,001 % (v/v) Mix oligoelementos

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

0,43 % (p/v) $CaSO_4$

Solución ajustada a pH 6.7

Mix oligoelementos: 0,203 % (p/v) $MnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,022 % (p/v) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,008 % (p/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,001 % (p/v) $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O$; 0,143 % (p/v) H_3BO_3 .

2.1.3. Medio MS (Murashige & Skoog).

El medio MS (Murashige & Skoog, 1962) se usó para el cultivo *in vitro* de plantas de *A. thaliana*, junto con los antibióticos adecuados en cada caso .

0,22 % MS (Duchefa)

1 % Sacarosa

0,8 % Agar

2.2. Medios para el cultivo de levaduras

2.2.1. YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)

El medio YPD es un medio rico para el cultivo de cepas de *S. cerevisiae* (Sherman et al., 1981).

2 % (p/v) Peptona bacteriológica

1 % (p/v) Extracto de levadura

2 % (p/v) Glucosa

Para su uso en medio sólido, se añadió 2 % de agar bacteriológico.

2.2.2. SD (Synthtetic Dextrose)

El medio SD se usó como medio selectivo para el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* (Sherman et al., 1981).

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*, para el que pH se ajustó a 3,5, adicionando 0,1N HCl. El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2 % agar bacteriológico para las transformaciones de levadura o 2 % de agarosa para los ensayos de metales. Se adicionaron los siguientes requerimientos nutricionales según las auxotrofias de cada cepa de levadura usada: 0,01 % de adenina, histidina, leucina, lisina, metionina, triptófano o uracilo. Para el medio SD (-S), se usó 0,17 % YNB ("*yeast nitrogen base*" sin sulfato amónico y

sin aminoácidos, Difco™) donde se substituyó el sulfato amónico por 0,5 % de cloruro amónico.

2.3. Medios para el cultivo de bacterias.

2.3.1. TY (Tryptone Yeast)

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

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. YMB (Yeast Mannitol Broth)

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

0,04 % (p/v) Extracto levadura

0,1 % (p/v) Manitol

0,01 % (p/v) K₂HPO₄

0,02 % (p/v) MgSO₄

0,01 % (p/v) NaCl

Se ajustó el pH a 6,8.

2.3.3. LB (Luria-Bertani)

El medio LB se usó para el crecimiento de cepas de *E. coli*, de *A. rhizogenes* y de *A. tumefaciens* (Bertani, 1951).

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 (Super Optimal broth with Catabolite repression)

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

2 % (p/v) Triptona

0,5 % (p/v) Extracto de levadura

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucosa

El pH se ajusta a 7,0.

2.3.5. SOB (Super Optimal Broth)

El medio SOB (Hanahan, 1983) se utilizó para el crecimiento de células de *E. coli* destinadas a la preparación de competentes.

2 % (p/v) Triptona
0,5 % (p/v) Extracto de levadura
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

El pH se ajustó a 7,0.

2.3.6. TB (Terrific Broth)

El medio TB se utilizó como medio de recuperación de células durante el proceso de obtención de células competentes de *E. coli* (Sambrook & Russell, 2006).

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.

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

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

- 1) Tras 15 días de crecimiento de las plántulas de *M. truncatula* en turba:vermiculita (3:1), y cuando éstas presentaban entre 2 y 3 hojas, se recogió una de ellas, y se congeló en nitrógeno líquido. Se homogeneizó en frío usando una lanceta de plástico.
- 2) Se añadieron a cada muestra 600 µl de tampón de extracción caliente (calentado previamente a 65 °C). El homogeneizado de hoja junto con el tampón, 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, al que previamente se le puso 500 µl de isopropanol y 50 µl de 3 M acetato de sodio pH 5,2. Se mezcló por inversión y se precipitó a -20 °C durante al menos 60 minutos.
- 5) Se centrifugó a 15.000 x g 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 con pipeta y poniendo los tubos a 37 °C durante 5 minutos para ayudar a su evaporación completa.
- 7) Se resuspendió el pellet en 40 µl de agua libre de DNAsas y se congelaron las muestras a -20 °C.
- 8) Se usaron 10-50 ng para cada 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.

Para la extracción de ADN genómico, se usó el kit DNeasy® Plant Mini Qiagen (Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Las muestras de hoja (aprox. 100mg de tejido) previamente congeladas, se machacaron con nitrógeno líquido en mortero. Una vez triturada la muestra, se añadieron 800 µl de tampón AP1 y 8 µl de RNasaA directamente al mortero.
- 2) La mezcla se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se incubó durante 10 minutos a 65 °C. Se agitó vigorosamente 3 veces durante el periodo de incubación.
- 3) Se añadieron 260 µl de tampón P3. Se mezcló por agitación e incubó durante 5 minutos en hielo.
- 4) Se centrifugó durante 5 minutos a 20.000 x g.
- 5) Se pipeteó a una columna QIAshredder encajada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 x g.
- 6) El líquido recogido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo, sin alterar el sedimento. Se añadieron 1,5 volúmenes de tampón AW1 y se mezcló por inversión.
- 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 x g. Se eliminó el líquido

resultante y 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 x g. Se eliminó el líquido resultante.
- 9) Se añadieron 500 µl de tampón AW2, y se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 x g. Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector.
- 10) Se añadieron 50 µl de agua MilliQ y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó durante 1 minuto a 6.000 x g para eluir el ADN.

3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

De un cultivo de *E. coli* saturado, se tomaron 5 ml y se centrifugaron 1 minuto a 12.000 x g. Tras descartar el sobrenadante, se usó el sedimento de células para la extracción de plásmido, usando el kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) del siguiente modo:

- 1) El precipitado celular se resuspendió en 250 µl de la solución A1.
- 2) Inmediatamente después se añadieron 250 µl de la solución de lisis A2. Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se añadieron 300 µl de la solución de neutralización A3. Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 x g. El sobrenadante se traspasó a una columna NucleoSpin Plasmid.
- 4) Se centrifugó 1 minuto a 11.000 x g y se descartó el líquido retenido en el tubo colector.
- 5) Se adicionaron 600 µl de tampón A4 y se centrifugó 1 minuto a 11.000 x g para posteriormente eliminar el líquido resultante de la centrifugación.
- 6) Se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 11.000 x g para eliminar posibles restos de solución A4. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- 7) Se añadieron 30 µl de agua MilliQ y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para resuspender el plásmido unido a la columna. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 x g para recoger la muestra.

3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras.

Transformantes de levaduras se crecieron en 10 ml de medio SD suplementado con las auxotrofías requeridas, durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se procedió a la obtención de ADN plasmídico usando el siguiente protocolo:

- 1) Cada cultivo se centrifugó a 12.000 x g. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se

resuspendió en 500 µl de agua estéril para lavar las células.

- 2) Tras transferir las células en suspensión a un tubo de microcentrífuga, se volvió a centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad y se retiró el sobrenadante.
- 3) Posteriormente, se resuspendieron las células en 0,2 ml de tampón de extracción, 0,2 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de cuentas de cristal de 600 µm de diámetro estériles.
- 4) Se agitó vigorosamente la mezcla con ayuda de un vórtex durante al menos 4 minutos. Seguidamente se añadieron 0,2 ml de TE y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 x g.
- 5) Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de isopropanol y se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente.
- 6) Transcurrido ese tiempo, se centrifugó 10 minutos a 10000 x g. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 70 % etanol.
- 7) Se volvió a centrifugar 1 minuto a máxima velocidad, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el sedimento, con el fin de evaporar todo el etanol restante.
- 8) El precipitado se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ.

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

TE: 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA.

3.5. Extracción de ARN de plantas.

La recogida de muestras vegetales para la extracción de RNA se llevó a cabo siempre entre las 10-12 horas de la mañana, con el fin de minimizar los efectos del ritmo circadiano. Cada muestra, formada por el tejido de al menos tres plantas seleccionadas al azar, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C para su uso posterior.

- 1) Las muestras congeladas se trituraron en mortero, con ayuda de nitrógeno líquido. Una vez molidas, se añadió 1 ml de Tri-Reagent® (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) directamente al mortero y se homogeneizó con la muestra vegetal.
- 2) El homogeneizado se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se conservaron en frío mientras que las otras muestras eran procesadas.
- 3) Una vez homogeneizadas todas las muestras, se incubaron 5 minutos a temperatura

ambiente, y se les adicionó 100 µl de cloroformo. Se mezcló por inversión y se volvieron a incubar 3 minutos más a temperatura ambiente.

- 4) Se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo donde se le añadió 1 µl de glicógeno (concentración final 35 µg/µl) y 500 µl de isopropanol.
- 5) Se dejó precipitar durante 16 horas a -20 °C.
- 6) Se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con etanol 75 % (v/v) y se volvió a centrifugar a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C.
- 7) Tras retirar el sobrenadante del lavado, se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente para evaporar los restos de etanol. Se resuspendió el pellet en 40 µl de agua libre de RNAsas y se incubó durante 5 minutos a 60 °C.
- 8) Posteriormente se trataron las muestras con DNasa para eliminar el ADN presente en la muestra. Para ello se añadió por cada muestra: 2,5 µl de DNasa Turbo™ Ambion® (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU), 5 µl del Buffer de la DNasa Turbo y 2,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.
- 9) Para la limpieza posterior del RNA se utilizó el kit RNeasy® Mini de Qiagen (Valencia, CA, USA) según se detalla en los siguientes apartados.
- 10) Se ajustó el volumen de la muestra a 100 µl con agua libre de RNAsa, a los que se le añadieron 350 µl de solución RLT y 3,5 µl de β-mercaptoetanol.
- 11) Tras mezclar la solución anterior, se añadió 250 µl de etanol 100 %. Se mezcló por inversión y se transfirió la muestra a las columnas RNAeasy Mini.
- 12) Se centrifugaron las columnas a 8.000 x g durante 1 minuto y se eliminó el residuo líquido del tubo colector.
- 13) Posteriormente se dio un segundo tratamiento de DNasa. Para ello se adicionó directamente a la columna, 80 µl de DNAsal diluida en buffer RDD (10 µl de DNAsal en 70 µl de Buffer RDD) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 14) Para inactivar la DNasa, se añadieron 350 µl de solución RW1 y se centrifugó a 8.000 x g durante 15 segundos. Se eliminó el residuo líquido del tubo colector.
- 15) Para lavar la columna se añadieron 500 µl de solución RPE y se centrifugó a 8.000 x g durante 1 minuto. Se eliminó el residuo líquido resultante y se repitió este paso una vez más.

- 16) Para eluir el ARN de la columna se añadió 30 µl de agua libre de RNAsas, y se incubó 5 minutos. Para recoger este ARN, se centrifugó a 8.000 x g durante 1 minuto. Con el fin de incrementar el rendimiento, se repitió este paso por segunda vez.

3.6. Cuantificación de ADN y de ARN

El ADN y el ARN extraído se cuantificó con la ayuda de un Nanodrop ND-1000 UV/Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Se usó 1 µl de la extracción para medir la concentración. Para saber si las muestras estaban libres de la presencia de proteínas y/o fenol, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, cuya relación entre ambas debía de ser superior a 1.8 para considerar la muestra libre de proteínas. Para poder conocer la posible contaminación por carbohidratos, se usó la absorbancia obtenida de la relación entre 260/230 nm, debiendo esta ser superior a 2.

3.7. 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. Como tampón de carga 6X se empleó 0,25 % Orange G en 30 % glicerol que se añadió a las muestras. Para hacer visible el ADN o el ARN a la luz azul, los geles se tiñeron previamente con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

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

3.8. Electroforesis desnaturizante para visualización de ARN.

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) de agarosa en tampón MOPS 1X, al que se le añadieron 2,5 ml de 37 % formaldehído (por cada 50 ml) y se cargaron 500 ng de cada muestra de RNA junto con tampón de carga 2X. La electroforesis se llevó a cabo en tampón 1X MOPS 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 10X: 200 mM MOPS pH7; 50 mM Acetato Sódico; 10 mM EDTA disódico.

Tampón de carga 2X: 100 µl de formamida; 20 µl 10X MOPS; 38 µl de 37 % formaldehído; 42 µl agua MilliQ; 1 µl Bromuro de Etidio (5 mg/ml).

3.9. Recuperación de ADN desde geles de agarosa.

Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa, desde los cuáles se purificaron los fragmentos de ADN amplificados. La/s banda/s obtenidas en el gel se cortaron usando un bisturí y se depositaron en tubos de microcentrífuga, donde se procedió a su purificación. Para ello se empleó el kit NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), cuyo protocolo es el siguiente:

- 1) Para diluir la agarosa y liberar el ADN, se añadieron 200 µl de solución NTI por cada 100 mg de gel y se calentó durante 5-10 minutos a 50 °C. Durante ese tiempo, se agitaron los tubos con vórtex, para ayudar a la disolución total de la agarosa.
- 2) Una vez disuelta la banda por completo, la muestra se pasó a una columna NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 x g.
- 3) Se descartó el líquido residual retenido en el tubo colector y se lavó la columna mediante la adición de 700 µl de la solución NT3. Se centrifugó de nuevo 30 segundos a 11.000 x g.
- 4) Se repitió el paso anterior una vez más.
- 5) Para secar la columna de los restos de etanol, se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g.
- 6) Se añadieron 30 µl de agua MilliQ y se incubó durante 3 minutos para eluir el ADN. Por último, se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g para recuperar la muestra.

4. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.

Para la síntesis de ADNc, se usaron 500 ng de ARN de cada muestra, que se trataron según el protocolo del kit PrimeScript™ RT Reagent Kit (TAKARA, Kusatsu, Shiga, Japan), el cual consiste en:

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

Dentro de esta mezcla se añadieron 0,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). La reacción se incubó durante 15 minutos a 37 °C para que tuviera lugar la transcripción reversa por parte de la enzima y posteriormente

durante 5 segundos a 85 °C, para su inactivación. 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) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

5.1. PCR para amplificación de fragmentos (no cuantitativa).

Este tipo de PCR se usó con dos fines distintos: como método de comprobación o validación de la presencia de una secuencia de ADN en una muestra dada o para la amplificación de fragmentos de ADN para clonaje de secuencias. 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. Los oligonucleótidos empleados en ambos casos se muestran en el apartado 5.3. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa como se describe en el apartado 3.6. para el primer caso y como en el apartado 3.8. en el caso de que hubiera que clonar el fragmento amplificado.

5.1.1. PCR para el clonaje de secuencias.

Los fragmentos de interés 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 a la de una polimerasa convencional. En la Tabla 4 se indican las concentraciones de cada componente empleadas para la reacción, y en la Tabla 5 las condiciones de PCR utilizadas. La temperatura de hibridación es específica de cada pareja de oligonucleótidos empleados, citados en el apartado 5.3.

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos de PCR empleados para el clonaje de secuencias.

Componentes	Concentración Final (25µl)
5X tampón	1X
dNTPs	200 µM
Oligonucleótido 5'	0,2 µM
Oligonucleótido 3'	0,2 µM
DMSO	3 %
Polimerasa Phusion®	0,5 U
DNA	10-20 ng

Tabla 5. Condiciones estándar de PCR utilizadas.

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Hibridación	50-60 °C	30 segundos	
Elongación	72 °C	30 segundos/ Kb	
Elongación final	72 °C	7 minutos	1
Mantenimiento	12 °C	∞	1

5.1.2. PCR para la comprobación de fragmentos de ADN

Este tipo de PCR fue el empleado para la comprobación de la presencia de un fragmento clonado en bacteria (PCR de colonia), para detectar la ausencia de amplificación en las extracciones de ARN o para el genotipado de mutantes a partir de ADN de planta. Para todos estos casos se usaron dos tipos de polimerasas: Taq Polimerasa de BIOTOOLS® y DreamTaq® (Thermo, Waltham, Massachusetts, EEUU). Los componentes de la reacción y sus concentraciones se detallan en la Tabla 6. Y las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 7.

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos usados para PCR.

Componentes	Concentración Final (25µl)	Concentración Final (25µl)
	Taq BIOTOOLS®	DreamTaq®
10X tampón	1X	1X
dNTPs	200 µM	200 µM
Oligonucleótido 5'	0,2 µM	0,2 µM
Oligonucleótido 3'	0,2 µM	0,2 µM
Polimerasa	1 U	0.75 U
DNA	10-100 ng	5 pg-1 µg

Tabla 7. Condiciones de PCR usadas.

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Hibridación	55 °C	30 segundos	
Elongación	72 °C	60 segundos/ Kb	
Elongación final	72 °C	7 minutos	1
Mantenimiento	12 °C	∞	1

En el caso concreto de las PCR de colonia, para comprobar el fragmento clonado, se usó (en sustitución del ADN) directamente la colonia bacteriana, recogida con una punta de pipeta estéril. Con ella, previamente se hizo una réplica en una placa, y acto seguido se introdujo en el tubo de PCR para su análisis.

Para el genotipado de las líneas segregantes de *M. truncatula*, procedentes de la colección de mutantes de la Samuel Roberts Noble Foundation, se usó también este tipo de PCR. Cada muestra a analizar (ADN procedente de una planta) fue sometida a tres PCR, con el fin de determinar el estado de heterozigosis u homozigosis de esas plantas. Estas tres PCR fueron las siguientes:

1º- Se usaron dos cebadores específicos del transposón Tnt1 (Tnt1-Fw + Tnt1-Rv).

2º- Un oligonucleótido específico del transposón y uno del gen. Si el transposón se encuentra insertado en sentido 5'→3', la combinación de cebadores sería Gen-Fw + Tnt1-Rv o Tnt1-Fw + Gen-Rv. Si el transposón se encuentra insertado en la orientación inversa a la fase de lectura, se usaron las combinaciones Gen-Fw + Tnt1-Fw, o Tnt1-Rv + Gen-Rv (Figura 4).

Figura 4. Diagrama que representa las combinaciones de oligonucleótidos usados para la comprobación de la segregación de los mutantes Tnt1 de *M. truncatula*.

5.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para llevar a cabo este tipo de PCR, se usaron por reacción: 0,5 µl de una dilución 1:10 del

ADNc (25 ng), los oligonucleótidos específicos del transcrito a amplificar (750 µM de cada uno), y 6 µl de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) hasta un volumen final de 10 µl. Para cada par de oligonucleótidos utilizado, se puso un control negativo sin ADNc para descartar posibles contaminaciones. El equipo que usado fue StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) con las condiciones que se recogen en la Tabla 8. La expresión del gen de estudio, se estandarizó a la expresión de otro gen constitutivo, en este caso, se usó el gen de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa* (*MtUb: Medtr4g077320*) de *M. truncatula*. Los niveles relativos de transcripción fueron calculados según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 8. Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas.

Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	40
60°C	1 minuto	
95°C	15 segundos	Curva de Desnaturalización o de <i>Melting</i>
60°C	1 minuto	
95°C	15 segundos	

5.3. Oligonucleótidos

En la siguiente Tabla 9 se detallan los oligonucleótidos usados en la presente Tesis Doctoral:

Nombre	Secuencia	Uso
5MtUBqF	GAACCTGTTGCATGGGTCTTGA	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para gen de la <i>MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa</i>
3MtUBqR	CATTAAGTTTGACAAAGAGAAAGAGACAGA	
5MtNRAMP1-1533	AAGGGGTTTGTAACGATGGTCAGT	qRT-PCR para MtNramp1
3MtNRAMP1-1659	GCTCTCTAAATGACTTGAAAGCAA	qRT-PCR para MtNramp1
5MtNRAMP2-1500	AACCAAGTGGAAGGAATTGTGG	qRT-PCR para MtNramp2
3MtNRAMP2-1617	TTGGATCCTTTATTCTGGTAGTGGT	qRT-PCR para MtNramp2
5MtNRAMP3-1431	TTTCAGGCATGGCAGTATATTTGG	qRT-PCR para MtNramp3
3MtNRAMP3-1598	TGGACTACTTCTCTGAGGCAATTGC	qRT-PCR para MtNramp3
5MtNRAMP4-1427	CTTCCTTCTGAGGTGAACAGCGTA	qRT-PCR para MtNramp4
3MtNRAMP4-1586	TCCATATTTTAATGTTGTGTAACCTTGTGT	qRT-PCR para MtNramp4

Nombre	Secuencia	Uso
5MtNRAMP5-1387	TTTCCTCTGAAGTGAGTGGAGCAGT	qRT-PCR para MtNramp5
3MtNRAMP5-1565	AACTTTGCGTGGTAGCTACTATTTG	qRT-PCR para MtNramp5
5MtNRAMP6-1527	TGTGCAACAGCATGGATTTTCATTTA	qRT-PCR para MtNramp6
3MtNRAMP6-1663	CTATATATTCACATCATCATCACCAAAAA	qRT-PCR para MtNramp6
5MtNRAMP7-1423	AATAACCGCTGCATATGTTGCATTC	qRT-PCR para MtNramp7
3MtNRAMP7-1549	CTGCAGTTCTAAGGATCCATTATTCA	qRT-PCR para MtNramp7
5MtFRO1qF	GGTGACACGTGGATCATCTG	qRT-PCR para MtFRO1
3MtFRO1qR	TTGCAATCCACAGGAACAAA	qRT-PCR para MtFRO1
5MtNramp1-XbaI	AATCTAGAATGGCACATCAAGAAGTGAAT	Clonaje de la secuencia codificante de MtNramp1 en pYPGE15
3MtNramp1-BamHI	TTGGATCCTCACAACTAGGTCCCTCTG	Clonaje de la secuencia codificante de MtNramp1 en pYPGE15
5MtNramp1p-HindIII	GGAAGCTTTTTTTATTTGAAGTTAGAATTA	Clonaje del promotor de MtNramp1 en pBI101
3MtNramp1p-BamHI	TTGGATCCGTTTACTATTACTATTCATCTC	Clonaje del promotor de MtNramp1 en pBI101
5GWMtNramp1p	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT TGAAGTTAGAATTAAACCAC	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtNramp1 en plásmidos Gateway.
3GWMtNramp1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAC AACCTAGGTCCCTCTGGTGC	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtNramp1 en plásmidos Gateway para fusión con 3xHA o GFP en C- terminal
5MtNramp1 + 1GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCACATCAAGAAGTGAAT	Clonaje de la secuencia codificante de MtNramp1 en vector Gateway para fusión con GFP en C-terminal.
MtUb v4qF	ATTCTTCACATGCGGCGATTAC	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para gen de la <i>MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa</i>
MtUb v4qR	TTTCTCATTTGCTTTTGGTGTGG	qRT-PCR para gen de la <i>MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa</i>
YSL1qF2	CGTCGAAAGCCATGACAGTGGT	qRT-PCR para MtYSL1
YSL1qR2	ACCGACAACATGAGACTCACGAA	qRT-PCR para MtYSL1
YSL2qF_v2	CGTGACGTGCAACCTCCGA	qRT-PCR para MtYSL2
YSL2qR_v2	ATGATACTCACTACTATTGCCCTAACC	qRT-PCR para MtYSL2
YSL3qF	CAGTTGCGCCGGTGTTGAAA	qRT-PCR para MtYSL3
YSL3qR_v2	TCACCGACAACATGAGACTTACA	qRT-PCR para MtYSL3
YSL4qF	GCTCTTTTTGGAGTTAAGCCTCCC	qRT-PCR para MtYSL4
YSL4qR	GGCAGATTTACAATGCATCAACAAGC	qRT-PCR para MtYSL4
YSL5qF	GACTATGCTGGAGCCGTTGCTTC	qRT-PCR para MtYSL5
YSL5qR_v2	TCAGAACTGTGTTCCGCAAGGA	qRT-PCR para MtYSL5

Nombre	Secuencia	Uso
YSL6+2346qF_v2	GGTTAGCATGTGTAGGGTATGTGGGAC	qRT-PCR para MtYSL6
YSL6+2467qR	CGGCACCATAAGCATTGCAGAAG	qRT-PCR para MtYSL6
YSL7qF_v2	CAGTGCTCACCATAATATCCATCATTGTG	qRT-PCR para MtYSL7
YSL7qR_v2	CGGCACCATAAGCATTGCAAAAA	qRT-PCR para MtYSL7
YSL8qF_v2	GTGTGGGCAGTTTGGTTGTGTTTGC	qRT-PCR para MtYSL8
YSL8qR	GGGAAGAAGCTCATGCATATTGGGG	qRT-PCR para MtYSL8
YSL9qF	CTCCATCAAGTCCACTAAACATCAAC	qRT-PCR para MtYSL9
YSL9qR	ATGTGTTCTGTCCAATGTTTCATCGG	qRT-PCR para MtYSL9
5MtYSLpGW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT TAGGGAGGTTTTTTTAGAG	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtYSL1 en plásmidos Gateway.
3MtYSLpGW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA TGTTTACAATGAAATTGA	Clonaje del promotor de MtYSL1 en pGWB3
3MtYSLGW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA TGTTCTAAGAAGGCATCAAC	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtYSL1 en plásmidos Gateway Gateway para fusión con 3xHA o GFP en C- terminal.
5MtYSL1+1GW-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT GTCTTCTGAACCCCATCGA	Clonaje de la secuencia codificante de MtYSL1 en plásmidos Gateway para fusión con GFP en C- terminal
5MtYSL1+1GW-N	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGTCTTCTGAACCCCATCGA	Clonaje de la secuencia codificante de MtNramp1 en vector Gateway para fusión con GFP en N-terminal.
3MtYSL1+3996GW-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTC AATGTTCTAAGAAGGCATCAAC	Clonaje de la secuencia codificante de MtNramp1 en vector Gateway para fusión con GFP en N-terminal.
5MtYSL1+1_PstI	AAAACTGCAGATGTCTTCTGAACCCCATCGA	Clonaje de la secuencia codificante de MtYSL1 en pDR196
3MtYSL1+4002_XhoI	AAAACTCGAGTCAATGTTCTAAGAAGGC	Clonaje de la secuencia codificante de MtYSL1 en pDR196
Tnt1-4	TCCTTGTTGGATTGGTAGCCAACCTTTGTTG	Genotipado de mutantes R108. Específico de Tnt1
Tnt1-3	TCCTTGTTGGATTGGTAGCCAACCTTTGTTG	Genotipado de mutantes R108. Específico de Tnt1
YSL1.2-Fv.2	CGAAAGCCATGACAGTGGT	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL1
YSL1.2-Rv.2	AGGGGGTAATTAGATTAAACCAA	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL1
5MtYSL8-2038GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC GCTAATAAAATCAAATCAGT	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtYSL8 en plásmidos Gateway.
3MtYSL8-20GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAT GGATTACAGATTCCACCAC	Clonaje del promotor de MtYSL8 en pGWB3
3MtYSL8+3259GW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTC CTAGATGGGAAGAAGCTCAT	Clonaje del promotor y de la secuencia de MtYSL8 en plásmidos Gateway Gateway para fusión con 3xHA.
Tnt1-F	GACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	Genotipado de mutantes R108. Específico de Tnt1
Tnt1-R	CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG	Genotipado de mutantes R108. Específico de Tnt1

Nombre	Secuencia	Uso
YSL8-Fw-1	ATAAATTAATGTGTCCAGGGTCTACAAC	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL8
YSL8-Re-1	TTGCTTCTAGTATCCATTGGATTCACAG	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL8
YSL8-Fw-2	ATTGATTTTAAAGAACGTGGTCAAAGAG	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL8
YSL8-Re-2	AGAATCATAGAGCAAGAGAAATGCAGAC	Genotipado de mutantes R108. Específico de MtYSL8

6. CLONACIÓN.

6.1. Vectores usados

Todos los vectores usados para clonación en este trabajo, se recogen en la Tabla 10.

Tipo	Nombre	Selección bacteria	Selección planta/levadura	Características	Descrito en
Vector de entrada	pDONR207	Gm ^R	-	vector de entrada	
Vectores binarios	pBI101	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado gen β -glucuronidasa	(Jefferson et al., 1987)
	pGWB3	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado gen β -glucuronidasa	(Nakagawa et al., 2007)
	pGWB5	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del "cauliflower mosaic virus", fusión a GFP en C-terminal	(Nakagawa et al., 2007)
	pGWB6	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del "cauliflower mosaic virus", fusión a GFP en N-terminal	(Nakagawa et al., 2007)
	pGWB13	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado a 3 epítomos HA en el extremo C-terminal	(Nakagawa et al., 2007)
	pGWB2	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del "cauliflower mosaic virus", sin tag	(Nakagawa et al., 2007)
	pYPGE15	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3	Promotor Fosfoglicerato Kinasa 1, sin tag	(Brunelli & Pall, 1993)
	pDR196	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3	Promotor PMA1, marcador seleccionable lacZ, sin tag	(Rentsch et al., 1995)

Tipo	Nombre	Selección bacteria	Selección planta/levadura	Características	Descrito en
Vectores de expresión en levaduras	pGEV-Trp	Amp ^R	Marcador seleccionable TRP1	Promotor MRP7, inducible por β -estradiol. Produce activador del promotor GAL1	(Gao & Pinkham, 2000)
	pGEV-Leu	Amp ^R	Marcador seleccionable LEU2	Promotor MRP7, inducible por β -estradiol. Produce activador del promotor GAL1	(Gao & Pinkham, 2000)
	pYES6CT_rfA	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3 y Blasticidina ^R	Promotor GAL1, fusión con tag de 6His	Invitrogen (Life Technologies) (Chu et al., 2010)
Vectores binarios	PM-CK-pBIN	Rif ^R		Promotor Nopalina Sintasa, marcador membrana plasmática en cyan	(Nelson et al., 2007)
	p19-pBIN6	Rif ^R		Promotor 35S, proteína p19 de <i>Tomato bushy stunt virus</i>	(Voinnet et al., 2003)

6.2. Clonación Gateway

Las secuencias destinadas a ser clonadas mediante esta técnica, se amplificaron por PCR (ver apartado 5.1.1.) y se purificó el producto de PCR como se indica en el apartado 3.8. Posteriormente se clonaron por recombinación utilizando el sistema Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Para ello, se llevaron a cabo dos reacciones, la reacción BP o la reacción LR, en función de los sitios *att* flanqueantes usados en el proceso de recombinación. En el caso de la reacción BP, un producto de PCR (con sitios *attB*), recombina con los sitios *attP* presentes en el plásmido de entrada pDONR207, mediante la acción de una Clonasa BP (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Esta recombinación crea un clon de entrada con sitios *attL*, que en la segunda reacción LR, es capaz de transferirse mediante la Clonasa LR, a vectores de destino que presentan sitios *attR*. Los vectores de destino que se usaron en este trabajo son tipo pGWB y se detallan en la Tabla 8. Los reactivos y concentraciones para llevar a cabo cada una de las reacciones se detallan en la Tabla 11. Cada reacción se incubó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas y posteriormente se transformó cada una de las clonaciones, en *E. coli* DH5 α .

Tabla 11. Reacciones de recombinación Gateway.

Componentes de la reacción	Reacción BP	Reacción LR
Inserto	Producto de PCR- <i>attB</i> (75 ng)	Clon de entrada- <i>attL</i> (75 ng)
Vector	pDONR207- <i>attP</i> (75 ng)	Vector destino pGWB- <i>attR</i> (75 ng)
Mix Enzimas	Clonasa BP (1 μ l)	Clonasa LR (1 μ l)
Agua	Hasta 5 μ l	Hasta 5 μ l

6.3. Clonación mediante ligación de fragmentos de restricción

Para llevar a cabo este método de clonación, primero, se escogió la enzima de restricción en función de las dianas presentadas en el sitio multiclonación del plásmido de destino y en función de que el inserto no presentara dianas para estas enzimas a lo largo de su secuencia. Ambas cosas se tuvieron en cuenta para la elección de la pareja de enzimas de restricción que se usarían para la clonación. Para poder introducir el inserto en el vector de interés, se diseñaron oligonucleótidos con dianas para las enzimas de restricción elegidas. Con ellos, se amplificó el fragmento de interés (ver apartado 5.1.1.) para incorporar dichas dianas al producto de PCR. Posteriormente se llevó a cabo la digestión del producto de PCR y del plásmido, con las mismas enzimas, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Thermo, Waltham, MA, EEUU), como se detalla en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones y reactivos para corte con enzimas de restricción

Componentes de la reacción	ADN plasmídico	Producto de PCR
Tampón 10x FastDigest®	1X	1X
DNA	$\leq 1 \mu\text{g}$	$\leq 0,2 \mu\text{g}$
Enzimas FastDigest® (Thermo)	1 U	1 U
Agua	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Tanto la digestión del inserto, como la del plásmido se cargaron en geles de agarosa, se cortó la banda correspondiente a cada uno de ellos y se recuperaron como se detalla en el apartado 3.8. La ligación de fragmentos de ADN digeridos se llevó a cabo con la enzima DNA ligasa T4 (Life Technologies Carlsbad, EEUU) siguiendo un ratio 3:1 (inserto:vector) durante 16 horas a 16 °C. Por último, se transformó la ligación en *E. coli* DH5 α .

6.4. Clonación por recombinación homóloga.

Este método de clonación permite unir fragmentos de ADN sin necesidad de usar una ligasa, sino que en su lugar se usa el mecanismo natural de reparación de ADN de levaduras (Ma et al., 1987). Para llevarlo a cabo, se requiere que el fragmento y el vector que vayan a ser ligados, compartan 40 pb de homología en sus extremos. Esto se consiguió linealizando el plásmido con una enzima de restricción y la secuencia homóloga de 40 pb que flanquea ambos lados del sitio de corte, se añadió a cada uno de los cebadores para amplificar el inserto por PCR. Una vez amplificado y purificado, este inserto se transformó junto con el vector linealizado, directamente en levaduras, donde se llevaría a cabo el evento de recombinación homóloga entre el inserto y el plásmido. Para este trabajo, se usó un ratio de 7:1 (inserto:vector) para la transformación.

7. TRANSFORMACIÓN

7.1. Transformación de células de *E. coli*

7.1.1. Preparación de células quimiocompetentes

Para la obtención de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Se inocularon 250 ml de SOB con 50 μ l de un cultivo saturado de células DH5 α .
- 2) Se incubó el matraz a 18 °C en agitación durante 48 horas hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,6 - 0,7. Una vez alcanzada esta OD, se enfrió el cultivo en hielo, y el resto de pasos se realizaron en frío.
- 3) Se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga fríos (atemperados previamente en el hielo durante al menos 15 minutos).
- 4) Se centrifugaron las células a 5.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante.
- 5) Se resuspendieron las células en 80 ml de TB y se incubaron 10 minutos en hielo.
- 6) Se centrifugaron las células de nuevo a 5.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.
- 7) Las células se volvieron a resuspender en 20 ml de TB y se añadió glicerol estéril a una concentración final del 20 % (v/v). Se incubaron durante 10 minutos en hielo.
- 8) Se dispensaron en tubos de microcentrifuga alícuotas de 400 μ l y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

7.1.2. Transformación de células quimiocompetentes

Las células de *E. coli* DH5 α , guardadas a -80 °C, se descongelaron lentamente en hielo. Una vez descongeladas, se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Se añadieron 10-150 ng de plásmido a un volumen de 50 μ l de células quimiocompetentes DH5 α .
- 2) La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos.
- 3) Posteriormente se sometió a la reacción de transformación a un choque térmico de 42 °C durante 1 minuto, tras el cual, el tubo con la mezcla se volvió a incubar en hielo durante 2 minutos.
- 4) Para la recuperación de las células se añadió 1 ml SOC y se incubaron a 37 °C durante una hora.
- 5) Las células se plaquearon en LB con los antibióticos requeridos por el plásmido transformado.

7.1.3. Preparación de células electrocompetentes

El protocolo descrito por (Ausubel et al., 1995), fue el usado para hacer células electrocompetentes de *E. coli*.

- 1) Partiendo de un cultivo saturado de *E. coli*, se inoculó 1 litro de LB a una OD₆₀₀ inicial de 0,02 y se dejó creciendo a 37 °C hasta alcanzar fase exponencial.
- 2) Al llegar a una OD₆₀₀ de 0,6, las células se pasaron a tubos estériles y se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.
- 3) Se resuspendieron las células en 200 ml de agua estéril previamente enfriada y se volvió a centrifugar a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.
- 4) Se lavaron de nuevo las células en 100 ml de agua estéril y se centrifugó con las mismas condiciones que en los pasos anteriores.
- 5) Se volvieron a lavar las células, en este caso con 50 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril. Se centrifugó y se repitió este paso una vez más.
- 6) Finalmente, se resuspendieron las células en 2 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril.
- 7) Se hicieron alícuotas de 50 μ l y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

7.1.4. Transformación de células electrocompetentes.

Las células de *E. coli* guardadas a -80 °C se descongelaron en hielo y se procedió a usar el siguiente protocolo para su transformación

- 1) A una alícuota de 50 µl de células, se le añadieron 10-50 ng de plásmido.
- 2) La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación (previamente enfriada en hielo) y se electroporó aplicando una descarga de 25 µF de capacitancia, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω en el electroporador ECM630 de BTX.
- 3) Posteriormente la mezcla se transfirió a un tubo de 1,5 ml al que se le añadió 1 ml SOC y se incubaron a 37 °C durante 3 horas para la recuperación de las células.
- 4) Finalmente, se plaquearon en LB con los correspondientes antibióticos.

7.2. Transformación de *Agrobacterium*

7.2.1. Preparación de células electrocompentes

Para hacer células competentes, tanto de *A. tumefaciens* C58C1, como de *A. rhizogenes* ARqua1, se siguió el protocolo descrito por (Wise et al., 2006):

- 1) Se inocularon 5 ml de LB (con los antibióticos necesarios), con la cepa de *Agrobacterium* y 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 hasta alcanzar OD₅₅₀ 0,5 – 0,8.
- 3) Una vez alcanzada es OD, el cultivo se enfrió en hielo, para impedir que las células sigan multiplicándose. El resto del protocolo se llevó a cabo en frío, y con todo el material a usar previamente enfriado.
- 4) Se sedimentaron las células por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.
- 5) Se resuspendieron las células cuidadosamente en 10 ml de agua fría estéril y una vez resuspendidas, se ajustó el volumen final a 500 ml.
- 6) Se repitió el paso anterior dos veces, resuspendiendo las células en volúmenes decrecientes: 250 ml la primera vez, y 50 ml la segunda.
- 7) Se centrifugaron las células a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 10 ml de glicerol estéril a una concentración final del 10 % (v/v).
- 8) Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrífuga y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

7.2.2. Transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*

Este protocolo de transformación se llevó a cabo del mismo modo, que el descrito en el apartado 7.1.4. para *E. coli*.

7.3. **Transformación de *S. cerevisiae***

Para la transformación de levaduras, se usó el método del acetato de litio descrito por (Gietz & Schiestl, 1991) que se describe a continuación:

- 1) Una colonia individual crecida en YPD sólido durante 48 horas, se utilizó para crecer un cultivo líquido de 5 ml de YPD durante 16 horas a 28 °C.
- 2) Desde este cultivo ya saturado, se inocularon 10 ml de YPD, de forma que la OD₆₀₀ inicial fuera de 0,1.
- 3) Se incubó a 28 °C en agitación, hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,4 (alrededor de 4 horas, tiempo variable según la cepa de levadura a transformar).
- 4) Una vez alcanzada esa OD₆₀₀, las células se sedimentaron por centrifugación a 3.000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 5 ml de Solución de Litio estéril.
- 5) Se centrifugaron las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 minutos. Mientras tanto, se hirvió el esperma de salmón (10 mg/ml) a 90 °C durante 10 minutos y se puso en hielo.
- 6) Se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 100 µl de Solución de Litio estéril.
- 7) Por cada 60 µl de células se añadieron 7 µl de esperma de salmón y el volumen necesario para una concentración de 0,1-1 µg totales de ADN plasmídico (plásmido cerrado). En el caso de la recombinación homóloga, se le adicionó la amplificación de PCR y el vector en un ratio 7:1 (inserto: vector) o el plásmido cerrado. La mezcla se agitó en vórtex.
- 8) Después, se adicionaron 0,45 ml de solución PEG estéril y se volvió agitar la mezcla.
- 9) Se incubaron las células a 30 °C durante 30 minutos.
- 10) Se les dio un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos.
- 11) Se plaquearon 200 µl en SD con los suplementos nutricionales requeridos para las auxotrofías de cada cepa y se incubaron durante 3-5 días a 28 °C.

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

Solución PEG: 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 M Acetato de Litio, 40 % polietilenglicol (PEG 4000 o 3350).

7.4. Transformación de *M. truncatula*

La transformación de plantas de *M. truncatula*, se realizó mediante la infección de plántulas con *A. rhizogenes* ARqua1, siguiendo la metodología descrita por Boisson-Dernier *et al.*, (2001).

- 1) Tras escarificación y esterilización de las semillas de *M. truncatula*, como se describe en el apartado 1.1, éstas se germinaron durante 16-20 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las radículas deben tener una longitud de no más de 1 cm.
- 2) Se escindió el ápice radicular (aprox. 3 mm) con un bisturí estéril y la raíz seccionada se arrastró sobre una placa con un césped de *A. rhizogenes* ARqua1 que contenía el plásmido a transformar.
- 3) Inmediatamente, cada una de las plántulas se transfirió a una placa con medio Fahreaus (Dazzo, 1982), suplementado con el antibiótico de selección en planta según el plásmido (ver Tabla 9) y se crecieron en la cámara de crecimiento *in vitro* a 22 °C y 16 horas de luz durante 21-28 días.
- 4) Tras ese periodo de tiempo, las plantas transformadas se transfirieron a macetas de perlita estéril. Se consideraron como plantas transformadas, aquellas que presentaban crecimiento de raíces laterales sobre el medio Fahreaus suplementado con el antibiótico.
- 5) Para los experimentos de nodulación, las plantas fueron inoculadas con *S. meliloti* a la semana de ser transplantadas y se volvió a repetir la inoculación a la semana siguiente. Con esta doble inoculación se asegura la nodulación.

7.5. Transformación de *N. benthamiana*

La expresión transitoria en hojas *N. benthamiana* se realizó mediante la infiltración con *A. tumefaciens*. A esta técnica a menudo se la conoce como “agroinfiltración” y se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Voinnet *et al.*, 2003):

- 1) Previamente a la transformación de *N. benthamiana* fue necesaria la transformación de *A. tumefaciens* C58C1 (ver apartado 7.2) con:
 - el plásmido que porta el gen que se desea expresar en tabaco, es decir, secuencia codificante de genes de *M. truncatula* previamente clonados en pGWB5 o pGWB6 (ADNc-pGWB5 y ADNc-pGWB6).

- el plásmido que lleva el marcador AtPIP2 de membrana plasmática PM-CK_pBIN
 - el plásmido que expresa p19 (supresor del silenciamiento génico).
- 2) A continuación, estos transformantes de *A. tumefaciens* C58C1, se crecieron en 5 ml de LB con los antibióticos apropiados, a 28°C durante 16 horas, hasta conseguir un cultivo saturado.
 - 3) Con 500 µl de cada uno de estos cultivos saturados, se inoculó un matraz, con 50 ml de LB y los antibióticos adecuados. Y se incubaron a 28 °C durante 16 horas.
 - 4) Estos cultivos se centrifugaron a 5.000 x g durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en el Tampón de Agroinfiltración hasta alcanzar OD₆₀₀ =1.
 - 5) Estas células resuspendidas en la solución de Agroinfiltración, se incubaron a temperatura ambiente durante 3-5 horas.
 - 6) Justo antes de agroinfiltrar, se mezclaron en la misma proporción las siguientes combinaciones:
 - p19 + PM-CK_pBIN (control negativo)
 - p19 + PM-CK_pBIN + ADNc-pGWB5
 - p19 + PM-CK_pBIN + ADNc-pGWB6
 - 7) Plantas de *N. benthamiana* con 3 semanas de crecimiento, se infiltraron con 20 ml de cada mezcla de resuspensión por hoja.
 - 8) Transcurridas 48 horas desde la infiltración, las hojas se escindieron en fragmentos de 0,5 cm y se observaron en un equipo confocal Leica SP8, formado por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000. Las imágenes captadas, se visualizaron a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). Para ello, las muestras se excitaron a 488 nm tanto para la GFP (*Green Fluorescence Protein*, en verde), y a 458 nm para la CFP (*Cyan Fluorescence Protein*, en azul cyan). La fluorescencia emitida, se recogió de 500-550 para la GFP, y de 450-490 en el caso de CFP. También se usó la luz de transiluminación para distinguir el contorno de cada una de las células epidérmicas de las hojas. Posteriormente, las imágenes captadas se montaron y procesaron usando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

Tampón de agroinfiltración: 10 mM MES pH 5,6; 10 mM MgCl₂ y 150 µM de Acetosiringona (en DMSO).

7.6. Transformación de *A. thaliana*

La transformación de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante la infiltración de los botones florales con *A. tumefaciens* C58C1. Este método se conoce como “*floral dip o dipping*” (del inglés) y se llevó a cabo mediante la adaptación del protocolo descrito por (Clough & Bent, 1998), como se detalla a continuación:

- 1) Las semillas de *A. thaliana* se sembraron directamente en macetas de 8x8 cm, y se estratificaron durante 48 horas, a 4 °C en oscuridad.
- 2) Transcurrido ese tiempo, se crecieron en cámaras de cultivo durante 5 semanas con 10 horas de fotoperiodo (ciclo corto, 10 horas luz y 14 horas oscuridad).
- 3) Después las plantas se pasaron a cámaras de cultivo con 16 horas de fotoperiodo (ciclo largo, 16 horas luz, 8 horas oscuridad) y 20-22 °C, para inducir la floración.
- 4) Cuando el tallo principal tuvo la inflorescencia desarrollada, ésta se cortó con el fin de favorecer el crecimiento de tallos laterales y así tener más inflorescencias para transformar.
- 5) Las plantas se transformaron (antes de éstas comenzaran a formar silicuas) con *A. tumefaciens* C58C1 que contenía el plásmido con el gen de interés. Para ello, se inocularon 200 ml de LB con los antibióticos adecuados, con 1,5 ml de un cultivo saturado de este transformante de *Agrobacterium*. El cultivo se incubó 16 horas a 28 °C.
- 6) Cuando la OD₆₀₀ fue mayor de 1,6, el cultivo se centrifugó a 5.000 x g durante 10 minutos.
- 7) El sedimento de células se resuspendió en el Medio de Infiltración, ajustando a una OD₆₀₀ de 0,8, y se añadió 0,03 % de Silwet® L-77 (Phytotechnology Laboratories), como surfactante, justo antes de transformar.
- 8) La mezcla se puso en un vaso de precipitados y se sumergieron las plantas boca abajo durante 5 minutos.
- 9) Se eliminó el exceso de inóculo golpeando suavemente las plantas sobre una toalla de papel, se envolvieron con una bolsa de plástico, y se dejaron en posición horizontal y en oscuridad durante 16 horas.
- 10) Se retiró la bolsa, y se dejaron a las plantas crecer hasta la producción de semillas.

Medio de Infiltración: 0,5 % medio MS; 5 % sacarosa; 0,5 g/L MES; ajustar pH a 5,7 con KOH.

8. DETECCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA (GUS).

Plántulas de *M. truncatula* transformadas con fusiones del promotor de interés, al gen de la

β-glucuronidasa, se recogieron, tras 28 dpi, y se trataron de acuerdo con el protocolo de (Vernoud et al., 1999), con ligeras modificaciones:

- 1) Las raíces y nódulos fueron recogidos en tubos con 40 ml de Solución GUS al que se le adicionaron 200 µl de X-GlcA (20 mg/ml). La mezcla se incubó durante 16 horas a 28 °C en oscuridad.
- 2) Transcurrido ese tiempo, se retiró la solución y se blanquearon las muestras con NaClO (25 mg/ml) durante 5 minutos. A continuación, se hicieron 3 lavados con agua. Las muestras se mantuvieron húmedas con agua.
- 3) Las imágenes de nódulos y raíces fueron tomadas con una lupa Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).
- 4) Posteriormente, se incluyeron tanto los nódulos, como las raíces en 6 % (p/v) de agarosa y se cortaron en secciones de 100 µm usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU).
- 5) Las secciones se observaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y las imágenes se tomaron usando el programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

Solución GUS: 0,69 % NaH₂PO₄; 0,2 % EDTA 0.5 M pH 8,0; 0,1 % N-lauril-sarkosina, 0,1 % Triton X-100).

X-GlcA: Sal sódica trihidratada de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico. Se preparó a 20 mg/ml en dimetilformamida.

9. INMUNOLocalización.

Se transformaron plantas de *M. truncatula* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4, con el plásmido pGWB13. En este caso, este vector, fusiona la secuencia del gen que se desea expresar en planta, a un epítipo HA (hemaglutinina) en el extremo C-terminal. Tras 28 dpi, se recogieron raíces y nódulos de estas plantas transformadas, y se siguieron los siguientes pasos:

1. Fijación, inclusión y corte de las muestras.

- 1.1) Se fijaron en la Solución de Fijación durante 16 horas a 4 °C en agitación.
- 1.2) Transcurrido ese tiempo, se eliminó el tampón de fijación y se lavaron las muestras con 1X PBS.
- 1.3) Posteriormente, se embebieron los nódulos y las raíces en 6 % (p/v) agarosa en agua y se cortaron en secciones de 100 µm usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO,

EEUU). Éstas se depositaron en portaobjetos de polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), sobre el cual se realizó la inmunohistoquímica.

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

1X PBS: 0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,144 % Na₂HPO₄; 0,024 % KH₂PO₄. Ajustar pH 7,4

2. Inmunohistoquímica:

- 2.1) Las muestras se deshidrataron usando series crecientes de metanol al 30 %, 50 %, 70 % y 100 % (v/v) en PBS durante 5 minutos en cada paso.
- 2.2) Posteriormente, los cortes se rehidrataron con las mismas concentraciones de metanol, pero en serie decreciente, 70 %, 50 %, 30 % y finalmente PBS, durante 5 minutos cada serie.
- 2.3) Para permeabilizar las paredes celulares, se dio un tratamiento con celulasa (Onozuka) al 4 % (v/v) en PBS, durante 1 hora. Para inactivar la enzima se usó 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 15 minutos.
- 2.4) Se lavaron los cortes con PBS durante 10 minutos y se bloquearon con 5 % (p/v) de BSA (albumina de suero bovino) en PBS, durante 30 minutos.
- 2.5) Tras retirar la solución de bloqueo, las muestras se incubaron, durante dos horas, con una dilución 1:40 en PBS del anticuerpo primario, en este caso, un anticuerpo monoclonal anti-HA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU).
- 2.6) Después, se lavaron las secciones tres veces con PBS (15 minutos cada lavado).
- 2.7) A continuación, se incubaron las muestras durante una hora, con una dilución 1:50 en PBS del anticuerpo secundario, en este caso, se trataba de un anticuerpo anti-ratón producido en conejo, y conjugado con el fluoróforo Alexa 594.
- 2.8) Se volvieron a hacer 3 lavados de 15 minutos con PBS.
- 2.9) Para teñir el ADN, las secciones se incubaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1-5 µg/ml, concentración final) durante 15 minutos.
- 2.10) Por último, se lavó el exceso de DAPI con agua destilada durante 5 minutos. Las muestras se conservaron en agua hasta su observación en microscopio confocal.

3. Observación de inmunohistoquímica con microscopio confocal.

Una vez realizada la inmunohistoquímica, las muestras se observaron en un equipo confocal Leica SP8, formado por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000. Las imágenes, se visualizaron a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). Las muestras se excitaron a 488 nm para el GFP (verde), y 561 nm para el Alexa 594 (rojo). Para

excitar el DAPI (azul) se empleó UV. La fluorescencia emitida se recogió desde 500-550 nm para GFP, de 600-660 nm en el caso del Alexa594, y entre 420-490 nm en el caso del DAPI. Las imágenes captadas se montaron y procesaron usando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

4. Visualización de la banda de Caspary

Tras la observación de la inmunohistoquímica de raíces con microscopio confocal, estas secciones de raíz fueron teñidas usando el método de la Berberina-Azul de anilina (Brundrett et al., 1988). Los cortes se incubaron con 0,1 % de berberina hemi-sulfato (Sigma) en agua durante 1 hora. Tras realizar 5-7 lavados con agua, las muestras se incubaron con 0,5 % de azul de anilina en agua durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavó con agua tantas veces fuese necesario hasta eliminar todos los restos de azul. Finalmente, los cortes se transfirieron a un porta con 0,1 % FeCl₃ en 50% glicerol donde se incubaron durante 5 minutos. Las muestras se montaron y observaron en esta misma solución y se observaron con luz UV en el equipo confocal Leica SP8, formado por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000.

10. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES.

Para la determinación del contenido de metales, las muestras de: partes aéreas, raíces y nódulos de plantas de *M. truncatula* 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).

11. LOCALIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE HIERRO.

Para la localización de la distribución de hierro, se usó el método de Perls-DAB (Roschztardt et al., 2009), con algunas modificaciones:

- 1) Nódulos y raíces de *M. truncatula* de 28 dpi, se recogieron directamente sobre la Solución de Fijación y se incubaron 3 horas y media a 4 °C, periodo durante el cuál se renovó el fijador una vez a las 2 horas.
- 2) Se hicieron dos lavados de 30 minutos con 2,5 % sacarosa en 50 mM de tampón fosfato potásico pH 7,4. Y se dejaron en esta solución durante 16 horas a 4 °C.
- 3) Tras la fijación, las muestras fueron sometidas a una deshidratación usando series

crecientes de etanol al 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 % y 100 % (v/v).

- 4) Tras la deshidratación, se embebieron las muestras en diluciones crecientes 1:3, 1:1, 3:1 de la resina LR White:etanol, hasta 100 % LR White (London Resin Company Ltd, UK).
- 5) Finalmente, los nódulos se incluyeron en cápsulas de gelatina llenas de LR White. La resina se polimerizó a 60 °C durante 24 horas.
- 6) Se realizaron secciones de nódulos y raíces, con un grosor de 1 μ m, con ayuda de un ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica, Vienna, Austria), equipado con una cuchilla de diamante.
- 7) Las secciones destinadas al análisis de estructura, se depositaron en portaobjetos de vidrio, y se tiñeron con 1 % (p/v) de azul de toluidina; 1 % de borato sódico y 1 % (p/v) de azul de metileno.
- 8) Las secciones para el estudio de la localización de hierro, se depositaron en portaobjetos de vidrio y se incubaron con la Solución Perls, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Se retiró el exceso y se lavaron las muestras tres veces con agua destilada.
- 10) A continuación, 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.
- 11) Se retiró el exceso y se lavaron las muestras 3 veces con 0,1 M tampón fosfato sódico pH 7,4.
- 12) Posteriormente se incubaron con la solución DAB durante 15 minutos para amplificación de la señal.
- 13) Se realizaron tres lavados con agua destilada para detener la reacción.
- 14) Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), equipado con una cámara digital Leica DFC 420C (Heerburgg, Suiza).

Solución de fijación: 0,5 % glutaraldehído; 4 % formaldehído, 2,5 % sacarosa en 50 mM de tampón fosfato potásico pH 7,4.

Solución Perls: mezcla en proporción 1:1 de 4 % (v/v) HCl y 4 % (v/v) de ferrocianuro potásico.

Solución DAB: 0,025 % (p/v) de 3, 3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB); 0,0006 % (v/v) H_2O_2 , y 0,005 % (v/v) CoCl_2 en 0,1 M tampón fosfato sódico pH 7,4.

12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA.

Las medidas de actividad nitrogenasa se llevaron a cabo usando el método de reducción de acetileno (Hardy et al., 1968).

- 1) Raíces y nódulos de 4-6 plantas de 28 dpi seleccionadas al azar, se introdujeron en viales de 30 ml cerrados con tapones de goma.
- 2) Un décimo del volumen de aire del vial (3 ml) se reemplazó por el volumen equivalente de acetileno.
- 3) Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 4) Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras de 0,5 ml por triplicado, y se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-8, con una columna Porapak N. El valor del de etileno producido, se determinó midiendo la altura en mV, del pico de etileno respecto a 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

13. BIOINFORMÁTICA.

13.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

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 de otros organismos, fueron obtenidas de Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>) y de NCBI

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) y se alinearon usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para la construcción de los árboles filogenéticos se usó MEGA7, empleando un algoritmo Neighbour Joining y FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para la visualización de los mismos. En la siguiente tabla se recogen todas las secuencias usadas:

1) Para MtNramp1:

Nombre	Organismo	Número de Acceso
MtNramp1	<i>M. truncatula</i>	Medtr3g088460
MtNramp2		Medtr3g088440
MtNramp3		Medtr2g104990
MtNramp4		Medtr3g102620
MtNramp5		Medtr5g016270
MtNramp6		Medtr8g028050
MtNramp7		Medtr4g095075
AtNramp1	<i>A. thaliana</i>	At1g80830
AtNramp2		At1g47240
AtNramp3		At2g23150
AtNramp4		At5g67330
AtNramp5		At4g18790
AtNramp6		At1g15960
OsNramp1	<i>O. sativa</i>	Os07g0258400
OsNramp2		Os03g0208500
OsNramp3		Os06g0676000
OsNramp4		Os01g0503400
OsNramp5		Os07g0257200
OsNramp6		Os12g0581600
GmDMT1	<i>G. max</i>	Glyma17g18010

2) Para MtYSL:

Nombre	Organismo	Número de Acceso
MtYSL1	<i>M. truncatula</i>	Medtr3g063490
MtYSL2		Medtr5g091600
MtYSL3		Medtr3g063520
MtYSL4		Medtr6g077870
MtYSL5		Medtr7g028250
MtYSL6		Medtr1g007540
MtYSL7		Medtr1g007580
MtYSL8		Medtr3g092090
MtYSL9		Medtr1g077840
AtYSL1	<i>A. thaliana</i>	At4g24120
AtYSL2		At5g24380
AtYSL3		At5g53550

Nombre	Organismo	Número de Acceso
AtYSL4		At5g41000
AtYSL5		At3g17650
AtYSL6		At3g27020
AtYSL7		At1g65730
AtYSL8		At1g48370
OsYSL1	<i>O. sativa</i>	Os01g0238700
OsYSL3		Os05g0251900
OsYSL4		Os05g0252000
OsYSL5		Os04g0390600
OsYSL6		Os04g0390500
OsYSL7		Os02g0116300
OsYSL8		Os02g0116400
OsYSL10		Os04g0674600
OsYSL12		Os04g0524600
OsYSL13		Os04g0524500
OsYSL14		Os02g0633300
OsYSL15		Os02g0650300
OsYSL16		Os04g0542800
OsYSL17		Os08g0280300
OsYSL18		Os01g0829900
ZmYS1	<i>Z. mays</i>	Zm00001d017429
ZmYSL2		Zm00001d025977
ZmYSL6		Zm00001d003941
ZmYSL11		Zm00001d025888
ZmYSL12		Zm00001d025887
ZmYSL14A		Zm00001d051193
ZmYSL17		Zm00001d054042
BdYS1A	<i>B. distachyon</i>	BRADI_3g50267
BdYS1B		BRADI_3g50263
BdYSL2		BRADI_3g50260
BdYSL3		BRADI_5g17230
BdYSL9		BRADI_5g17210
BdYSL10		BRADI_2g5395
BdYSL11		BRADI_5g16190
BdSYL12		BRADI_5g16170
BdYSL13		BRADI_5g16160
GmYSL7	<i>G. max</i>	GLYMA_11G203400
		GLYMA_09G164500
		GLYMA_16G212900

13.2. Estructura de la proteína

Las secuencias para los modelos de los genes Nramp se obtuvieron de la base de datos Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org/>;(Saier et al., 2014). El modelo de la proteína se realizó con el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>; (Guex et al., 2009).

13.3. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados, 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 primer BLAST (<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>)

13.4. Análisis de transcritos de *S. meliloti* y *M. truncatula*

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

1) Predicción de topología y dominios proteicos

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

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

RESULTADOS

1. MtNRAMP1

1.1. *M. truncatula* tiene 7 miembros de la familia de transportadores Nramp.

Con el fin de conocer cuántos miembros de la familia Nramp existen en *M. truncatula*, se llevó a cabo el análisis de su genoma (<http://www.jcvi.org/medicago/>). Éste mostró que existen 7 genes (MtNramp1 a MtNramp7), cuya secuencia es característica de la familia de transportadores Nramp (*Medtr3g088460*, *Medtr3g088440*, *Medtr2g104990*, *Medtr3g102620*, *Medtr5g016270*, *Medtr8g028050* y *Medtr4g095075*). Cuando todas estas secuencias, se compararon con la de otros transportadores Nramp conocidos en *A. thaliana* y en *O. sativa*, el análisis mostró que existen dos grupos filogenéticamente distintos (Figura 5). Por un lado, se encuentran AtNramp1 y 6 de *A. thaliana* y OsNramp1 y OsNramp3-5 de arroz que están relacionados con el transporte de hierro y/o manganeso generalmente en la raíz (Curie et al., 2000, Cailliatte et al., 2010, Takahashi et al., 2011, Sasaki et al., 2012, Tiwari et al., 2014, Yamaji et al., 2013).

Figura 5. Familia Nramp en *M. truncatula*. Árbol filogenético de la familia de transportadores Nramp en *M. truncatula*, MtNramp1-MtNramp7 (*Medtr3g088460*, *Medtr3g088440*, *Medtr2g104990*, *Medtr3g102620*, *Medtr5g016270*, *Medtr8g028050* y *Medtr4g095075*) y los homólogos de Nramp en *A. thaliana*, arroz y soja: AtNramp1 (*At1g80830*), AtNramp2 (*At1g47240*), AtNramp3 (*At2g23150*), AtNramp4 (*At5g67330*), AtNramp5 (*At4g18790*), AtNramp6 (*At1g15960*), OsNramp1 (*Os07g0258400*), OsNramp2 (*Os03g0208500*), OsNramp3 (*Os06g0676000*), OsNramp4 (*Os01g0503400*), OsNramp5 (*Os07g0257200*), OsNramp6 (*Os12g0581600*), y GmDMT1 (*Glyma17g18010*).

En el grupo opuesto están AtNramp2-5 y OsNramp2, donde AtNramp3 y 4 se han identificado como transportadores de tonoplasto en la semilla, donde median la removilización de hierro (Lanquar et al., 2005). Del resto no se han descrito sustrato, pero AtNramp2 y OsNramp2 no son capaces de transportar hierro (Curie et al., 2000). En cuanto a las leguminosas, en este mismo grupo se encuentra uno de los transportadores Nramp específico de nódulo y descrito en soja, GmDMT1 (Kaiser et al., 2003). Éste se localiza en la membrana del simbiosoma y filogenéticamente muy emparentados con él, se encuentran MtNramp5 y MtNramp7 de *M. truncatula* (Figura 5). En el grupo opuesto se encuentra MtNramp1-3, junto con los que anteriormente se han descrito como transportadores de hierro y manganeso principalmente.

1.2. *MtNramp1* es el gen de la familia Nramp con mayor expresión en nódulos.

Con el objetivo de determinar si algún transportador Nramp podría tener una función en el transporte de metales hacia el nódulo, se midieron, mediante PCR cuantitativa, los niveles de expresión de los 7 miembros de la familia Nramp de *M. truncatula*, en nódulos con 28 días post-inoculación (dpi), en raíces fertilizadas con nitrógeno y en raíces denoduladas (a las que se les han retirado los nódulos). De entre los 7 transportadores analizados, *MtNramp1* es el gen que más se expresaba en raíces denoduladas (Figura 6A) y el que más se expresaba en nódulos (Figura 6B), lo que podría indicar un papel importante de este transportador en este órgano. Ninguno de los otros 6 Nramp presentaba una expresión tan alta en raíz, ni tampoco en nódulo (Figura 7).

Figura 6. Expresión de los genes de la familia Nramp en raíces y nódulo. (A) Expresión en raíces denoduladas relativizada al gen constitutivo de referencia de la *ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*; (B) Expresión génica de los 7 miembros de la familia Nramp en nódulo, relativizada al gen constitutivo de referencia *ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*. Los datos son la media de $\pm$ ES de tres experimentos independientes; n.d. indica que no se detectó ningún transcrito.

Figura 7. Expresión génica de la familia *MtNramp*. Expresión de los 7 *MtNramp* en raíces fertilizadas con nitrógeno (RFN), raíces denoduladas (RD) y Nódulo (Nod), relativizada al gen constitutivo de referencia de la *ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*. Los datos son la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes.

Para conocer la estructura de la proteína MtNramp1 y confirmar que podría actuar como un transportador de metales, se modeló la estructura usando como referencia el cristal del transportador DMT de *Staphylococcus capitis* (Ehrnstorfer et al., 2014). El modelo resultante presentaba, los 11 dominios transmembrana característicos de los transportadores Nramp, y un alto grado de homología con ScDMT1, compartiendo incluso los mismos 4 aminoácidos que coordinan el metal (D60, N63, A232, y M235 en MtNramp1) (Figura 8).

Figura 8. Estructura terciaria de MtNramp1 (azul) y de *S. capitis* DMT1 (PDBID: 4WGW, amarillo) usado como molde. La posición del metal y los aminoácidos con los que coordina están indicados con flechas rojas.

1.3. MtNramp1 transporta hierro y manganeso hacia el citoplasma.

Para determinar el sustrato y la dirección del transporte de MtNramp1, se llevaron a cabo ensayos de complementación en levaduras mutantes en el transporte de metales. El homólogo más cercano de *MtNramp1* en levaduras es *SMF1* (Suppressor of Mitochondria import Function 1; *YOL122C*), un transportador que introduce manganeso al citosol. La mutación en este gen, impide a la levadura crecer en un medio sin manganeso (Figura 9A) (Supek et al., 1996). Para determinar si *MtNramp1* es funcionalmente equivalente a *SMF1*, su secuencia de ADN codificante se clonó en el vector de levaduras pYPGE15, bajo el control del promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa, y con este plásmido se transformó la levadura mutante *smf1*. Mientras que la cepa *smf1* con el plásmido pYPGE15 vacío, no era capaz de crecer en un medio sin manganeso, la levadura *smf1* transformada con *MtNramp1* adquiría la capacidad de crecer en este mismo medio, del mismo modo que la levadura tipo silvestre (Figura 9A), lo que sugiere que MtNramp1 puede transportar este metal. Dado que, *MtNramp1* era capaz de restaurar el fenotipo de la levadura *smf1* mutante en el transporte de manganeso, puede afirmarse que MtNramp1 transporta dicho metal.

Los transportadores Nramp también transportan hierro hacia el citoplasma, bien desde el exterior celular o desde algún orgánulo en el que este metal se encuentre almacenado (Curie et al., 2000, Lanquar et al., 2005, Peris-Peris et al., 2017). Para comprobar si MtNramp1 era capaz

de transportar hierro, se recurrió nuevamente a su expresión en levaduras. En este caso se usó una cepa limitada en su capacidad de captar hierro del exterior, ya que tiene mutados los genes *FET3* y *FET4*. El primero es una multicobre ferroxidasa implicada en la absorción de hierro (Askwith et al., 1994), y el segundo es un transportador de hierro de baja afinidad (Dix et al., 1994). Debido a ambas mutaciones, la levadura *fet3fet4* requiere altas concentraciones de hierro y pH ácido, que facilite la movilización de este nutriente, para poder crecer (Figura 9B).

Figura 9. Experimento de transporte de MtNramp1. (A) Transporte de manganeso. La cepa de levadura BY4741 se transformó con el plásmido vacío pYPGE15, y la cepa BR4742, derivada de BY4741 y mutada en *smf1*, se transformó con el vector pYPGE15 vacío o con pYPGE15::MtNramp1 CDS. Se hicieron diluciones seriadas (10x) de cada uno de los transformantes y se crecieron 3 días a 30°C en medio SD suplementado con los aminoácidos requeridos. El pH se tamponó con 50mM de MES y los niveles de Mn se mantuvieron bajos con la adición de 6.25 mM de EGTA. Los controles positivos se obtuvieron añadiendo 500 μ M de $MnSO_4$. (B) Transporte de hierro. La cepa de levadura DEY1451 se transformó con el plásmido vacío pYPGE15, y la cepa DEY1453, derivada de DEY1451 y mutada en *fet3* y *fet4*, se transformó con el vector pYPGE15 vacío o con pYPGE15::MtNramp1 CDS. Se hicieron diluciones seriadas (10x) de cada uno de los transformantes y se crecieron 3 días a 30°C en medio SD suplementado con los aminoácidos requeridos. Los controles positivos se realizaron con SD a un pH de 3.5 al que se le añadió 100 μ M de $FeCl_3$.

La expresión heteróloga de *MtNramp1* en levaduras *fet3fet4*, logró revertir su fenotipo, haciendo posible su crecimiento en condiciones de baja disponibilidad de hierro de igual forma que la levadura de tipo silvestre (Figura 9B). Todo ello indica que MtNramp1, además de transportar manganeso hacia el interior del citoplasma, también sería capaz de transportar hierro.

1.4. MtNramp1 se localiza en la membrana plasmática de las células de la zona de infección del nódulo.

Se han descrito transportadores Nramp en una amplia variedad de órganos y de orgánulos de plantas (Thomine et al., 2000, Oomen et al., 2009, Yang et al., 2013). La localización exacta de cada uno de ellos es clave para llevar a cabo sus funciones biológicas. Éstas van desde la captación del metal directamente desde el suelo, como es el caso de AtNramp1 de *A. thaliana* (Cailliatte et al., 2010), hasta la removilización de metales desde reservas intracelulares como es el caso de AtNramp3 y AtNramp4 y la vacuola (Lanquar et al., 2005). Los resultados de PCR cuantitativa mostraron que *MtNramp1* se expresa tanto en raíz, como en nódulo (Figura 6). Para comprobar si ésta es su única localización, se realizó una RT-PCR usando RNA extraído de todas las partes de la planta: de parte aérea y raíz de plantas noduladas y fertilizadas, y de nódulos. Los resultados muestran que la expresión de *MtNramp1* se encuentra restringida en raíces, independientemente de si la planta se encuentra en simbiosis o no, y en nódulos (Figura 10A). Para determinar el tejido en el que se expresa *MtNramp1* en estos órganos, se transformaron plántulas de *M. truncatula* con el promotor de *MtNramp1* fusionado con el gen de la β -glucuronidasa (*gus*). Se consideró como región promotora la región de ADN correspondiente a 2 kb, aguas arriba del codón de inicio. En condiciones simbióticas, la actividad GUS se detectó en raíces noduladas y en la región apical del nódulo (Figura 10B). Estos datos confirman los resultados de expresión de *MtNramp1* por PCR cuantitativa. Para una mayor resolución de la actividad GUS a nivel tisular, se hicieron cortes transversales de las raíces y cortes longitudinales de los nódulos. En ellos se observa que, *MtNramp1* se expresa concretamente en la zona de infección el nódulo (zona II) (Figura 10C) y en la raíz, se detecta actividad GUS en una capa de células alrededor del cilindro vascular y en unas células en el interior del mismo (Figura 10D).

Figura 10. Localización tisular de MtNramp1. (A) Expresión de MtNramp1 en parte aérea, raíz y nódulo de plantas no-noduladas fertilizadas con nitrógeno y plantas noduladas. Control positivo de la RT-PCR *MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa* (*MtUb1*). (B) Detección de la actividad GUS en raíces y en nódulos de plantas de *M. truncatula* transformadas con el plásmido pBI101 que contiene la fusión del promotor *MtNramp1::gus*. (C) Sección longitudinal de un nódulo de *M. truncatula* con actividad GUS, transformado con el plásmido pBI101 que contiene la fusión del promotor *MtNramp1::gus*. (D) Sección transversal de una raíz con actividad GUS, transformada con el plásmido pBI101 que contiene la fusión del promotor *MtNramp1::gus*. Barras de escala (A): 1mm; (B y C): 100µm.

Para verificar estos resultados de GUS y para determinar la localización subcelular de MtNramp1 se recurrió a la microscopía confocal y a técnicas de inmunolocalización. Para ello, se fusionó el gen completo *MtNramp1* (promotor, intrones y exones) con tres epítomos de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal. Para verificar si esta fusión no afecta a la función y a las capacidades de transporte de la proteína, se transformó la cepa de levadura *smf1* con un plásmido que expresaba de forma constitutiva la secuencia codificante de MtNramp1 fusionada en el extremo C-terminal con el epítipo HA (Figura 11). La levadura *smf1* transformada con *MtNramp1::HA* recuperaba su fenotipo mutante, por lo tanto, la proteína MtNramp1 es capaz de realizar su función de transporte a pesar de tener fusionado el epítipo.

Figura 11. Complementación de levaduras *smf1* con *MtNramp1*-HA. La cepa de levadura BY4741 se transformó con el plásmido pYPGE15 vacío, y la cepa BY4742 derivada de BY4741 mutada en *smf1* se transformó con pYPGE15 vacío y con pYPGE15::MtNramp1 ó con pYPGE15::MtNramp1-3xHA. Se hicieron diluciones seriadas de cada transformante, y se crecieron 3 días a 30°C en medio SD suplementado con los aminoácidos necesarios. El pH se tamponó con 50mM de MES y la concentración de Mn se mantuvo baja con 6.25mM de EGTA. Los controles positivos con suficiencia de manganeso se obtuvieron mediante la adición de 500μM de MnSO₄.

Plantas transformadas e inoculadas con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP, se recogieron y fijaron para llevar a cabo la inmunodetección del epítipo MtNramp1-HA. Para ello se usó un anticuerpo primario anti-HA producido en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluoróforo Alexa594 (rojo). Se usó DAPI (4', 6-diamino-2'-fenilindol) para teñir el ADN eucariótico (núcleos celulares) y bacteriano (azul). Al igual que en el experimento de fusión con el gen *gus*, MtNramp1-HA (Alexa594, rojo), se detectó en la región apical del nódulo, más concretamente en la zona de infección/diferenciación (zona II), como indicaban la presencia de los de los rizobios que expresan GFP y los canales de infección (Figura 12A). Con un mayor aumento, se observó la localización de MtNramp1-HA en las células en las cuáles los rizobios aumentan su tamaño y comienzan a diferenciarse (Figuras 12B). En estas células, MtNramp1 parecía localizarse en la periferia de la célula, en lo que podría ser la membrana plasmática (Figura 12C). Para descartar la inespecificidad de los anticuerpos usados, se usaron como control plantas transformadas con *MtNramp1* sin epítipo HA (Figura 13suplementaria 3).

Figura 12. Localización subcelular de MtNramp1-HA. (A) Sección longitudinal de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi, infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde) y transformado con un vector que expresa *MtNramp1-HA* bajo la regulación de su propio promotor. La localización de MtNramp1 se determina usando un anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo). El ADN se tiñó con DAPI (azul). Los canales de infección están marcados con asteriscos. (B) Detalle de células infectadas por rizobios en zona II. (C) Reconstrucción en 3D de una célula expresando *MtNramp1-HA*, en rojo. Los bacteroides de *S. meliloti* se muestran en verde y el núcleo de la célula (ADN) en azul por la tinción con DAPI. (D) Localización del marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP expresado transitoriamente en células de tabaco. (E) Localización de MtNramp1-GFP expresado transitoriamente en las mismas células. (F) Superposición de las imágenes D y E con una imagen de transiluminación de las células epidérmicas de tabaco. Barras de escala: (A): 100µm; (B): 15µm; (C) 5µm; (D-F): 50µm.

Figura 13. Control de especificidad de anticuerpo para microscopía confocal. Sección transversal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde) y transformado con un vector que expresa *MtNramp1* bajo la regulación de su promotor endógeno. La localización de *MtNramp1* se determinó usando un anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo). El ADN se tiñó con DAPI (azul). Los canales de infección se indican con asteriscos. Barra de escala 100µm.

Con el fin de verificar si el transportador *MtNramp1* se localiza de forma específica en la membrana plasmática, se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, la secuencia codificante de *MtNramp1* se fusionó a GFP en posición C-terminal bajo el promotor constitutivo 35S. Esta construcción, junto con un marcador de membrana plasmática (*AtPIP2*) fusionado con la proteína cian fluorescente (CFP), se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. La fluorescencia emitida por ambas construcciones se observó 48 horas después usando microscopía confocal. La señal de GFP correspondiente a *MtNramp1*, co-localiza exactamente con la señal cian del marcador de membrana, indicando que *MtNramp1* es un transportador de membrana plasmática (Figura 13D-F).

El patrón de expresión tisular de *MtNramp1* observado en nódulo, tanto en los experimentos de GUS como en los de inmunohistoquímica, coincidían con los datos de transcriptómica de las distintas zonas del nódulo, publicados recientemente por (Roux et al., 2014) y disponibles en la base de datos Symbimics. En ella se pudo ver igualmente que *MtNramp1* tenía sus máximos de expresión a lo largo de la zona II del nódulo (Figura 14A).

Figura 14. Expresión de *MtNramp1* en diferentes zonas del nódulo de *M. truncatula*. ZI, indica la zona I; ZII d, zona II distal (región más cercana a la zona I); ZII p, zona II proximal; IZ es la interzona entre la zona II y la zona III; ZIII, zona III. Los datos se obtuvieron de la base de datos Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>)

Además de en nódulos, en los ensayos de expresión y localización por GUS, también se detectó una actividad de MtNramp1 en el cilindro vascular de las raíces. Concretamente en una capa de células alrededor del mismo, y en el interior, asociado con el floema. Mediante cortes transversales de raíces transformadas con MtNramp1-HA y posterior inmunodetección, se dilucidó su localización. La capa de células alrededor de la vasculatura en las que se expresa *MtNramp1*, correspondía a la endodermis de la raíz, ya que la señal de Alexa 594 (rojo), se detectaba en las mismas células que presentan banda de Caspary (azul) (Figura 15E-F).

Figura 15. Localización de MtNramp1-HA en raíz. (A) Imagen de microscopía confocal con la localización de MtNramp1-HA en una sección transversal de raíces de 28dpi de *M. truncatula*, transformadas con un vector que expresa MtNramp1 bajo la regulación de su propio promotor. La posición de MtNramp1 se determinó usando un anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo). El ADN y el xilema se tiñó con DAPI (azul). (B) Imagen de transiluminación del corte transversal de raíz de la imagen A. (C) Superposición de los paneles A y B. (D) Detalle de la localización de MtNramp1-HA en raíces transformadas de *M. truncatula* (en rojo, por la unión con el anticuerpo conjugado con Alexa 594) y la superposición con la correspondiente imagen de transiluminación. (E) Localización de la banda de Caspary (azul) detectada por el método de la berberina-azul de anilina. (F) Superposición de los paneles D y E. Barras de escala, (A-C): 50µm; (D-F): 10µm.

1.5. La mutación de *MtNramp1* provoca una disminución en la actividad nitrogenasa.

Con el fin de estudiar el papel de MtNramp1 en la fijación simbiótica de nitrógeno, se obtuvieron líneas mutantes mediante la inserción de un transposón de tabaco Tnt1

(Transposable element from *Nicotiana tabacum*1), procedentes de la colección de mutantes de la Samuel Roberts Noble Foundation (Tadege et al., 2008). La línea NF20333 contenía una inserción en la posición +744 del cuarto exón del gen *MtNramp1* (Figura 16A), el cuál codifica la parte central del segundo dominio transmembrana (Figura 8). El genotipado de las plantas segregantes se llevó a cabo según se detalla en materiales y métodos, hasta la obtención de líneas homocigotas *nramp1-1*. En ellas, la expresión de *MtNramp1* era indetectable por PCR (Figura 10B), indicando así la pérdida de función de este gen en los mutantes *nramp1-1* (Figura 16B). Dado que *MtNramp1* se expresaba tanto en plantas noduladas, como en plantas fertilizadas (Figura 10A), el fenotipo de las plantas mutantes *nramp1-1* se evaluó bajo ambas condiciones.

Figura 16: Línea mutante por la inserción de *Tnt1* en *MtNramp1*. (A) Posición del lugar de inserción de *Tnt1* en el gen *MtNramp1* para dar lugar al mutante *nramp1-1* (NF20333). (B) Expresión por RT-PCR de *MtNramp1* en nódulos de 28dpi control (WT) y nódulos *nramp1-1* de *M. truncatula*. Control positivo, expresión de la *Ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*.

En condiciones no simbióticas, las plantas de tipo silvestre (WT) y *nramp1-1* se crecieron añadiendo nitrato amónico a la solución de riego, como única fuente de nitrógeno asimilable. Además, estas plantas se crecieron bajo deficiencia de hierro (0 μ M citrato férrico) y con un aporte de hierro (7,35 μ M citrato férrico) en la solución de riego, con el fin de ver si la deficiencia de hierro agravaba o no el fenotipo mutante *nramp1-1*. Las plantas *nramp1-1* fertilizadas con nitrato amónico presentaban un fenotipo similar al de las plantas silvestres. En términos de pesos secos y contenido de clorofilas, no se detectaron diferencias significativas entre mutante y el silvestre, independientemente de los niveles de hierro presentes en la solución nutritiva (Figura 17A-C).

Figura 17. Fenotipo del mutante *nramp1-1* en condiciones no-simbióticas. (A) Crecimiento de plantas representativas control (WT) y mutantes *nramp1-1*. Barra de escala= 1cm. La concentración de hierro usada está indicada debajo de la imagen. (B) Peso fresco de partes aéreas y de raíces. Los datos son la media $\pm$ ES (n=5 plantas). (C) Contenido en clorofila. Los datos son la media $\pm$ ES (n=3 plantas). (D) Contenido de hierro en raíces y partes aéreas de plantas control y *nramp1-1* bajo dos concentraciones diferentes de hierro. Los datos son la media $\pm$ ES de dos sets de un grupo de 5 plantas. * indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$). (F) Expresión de *MtFRO1* en plantas control y *nramp1-1* bajo dos concentraciones diferentes de hierro. Los datos son la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes. * indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Sin embargo, el contenido de hierro en las raíces de *nramp1-1* fue significativamente mayor, que en las silvestres, cuando las plantas se crecieron en condiciones de deficiencia de hierro (Figura 17D). Por el contrario, en partes aéreas, las plantas *nramp1-1* presentaban menores niveles de hierro que las de tipo silvestre en las mismas condiciones. Por lo tanto, *nramp1-1* acumularía más hierro en la raíz, llegando así menos metal a la parte aérea. Sin embargo, el hierro que llegaba a los tejidos fotosintéticos era suficiente, como para no ver diferencias en el contenido de clorofila. Con el fin de saber si las plantas *nramp1-1* tendrían activada la respuesta de deficiencia de hierro, al estar mutadas en un transportador de este metal, se midió la expresión de una ferroreductasa (*MtFRO1*; *Medtr8g028780*), como marcador de la respuesta de deficiencia de hierro en *M. truncatula* (Andaluz et al., 2009). Como resultado de este experimento, independientemente de los niveles de hierro en la solución nutritiva, no se observaron diferencias significativas en la expresión de *MtFRO1* entre las plantas tipo silvestre y las plantas *nramp1-1* (Figura 17E). Esto indicaría que los mutantes *nramp1-1* no tendrían alterada su homeostasis de hierro de forma significativa en condiciones no simbióticas, de ahí que no se observe ninguna alteración fenotípica.

Para evaluar el fenotipo de *nramp1-1* en condiciones simbióticas, las plantas se crecieron inoculadas con *S. meliloti* 2011, donde la única fuente asimilable de nitrógeno para la planta, es la proporcionada por la fijación de los rizobios simbióticos. Bajo estas circunstancias, los mutantes *nramp1-1* mostraron grandes defectos en el crecimiento, los cuales se traducían en una reducción del peso fresco del 79% en el mutante, comparado con las plantas silvestres (Figura 18A y C). Además, la mayor parte de los nódulos de *nramp1-1* eran blancos e inactivos, mientras que las plantas silvestres, mostraban nódulos rosas completamente activos (Figura 18B). Incluso, el número total de eventos de nodulación por planta era menor en el mutante; *nramp1-1* tenía un 36% menos nódulos que el WT (Figura 18D). Ambos eventos, un menor número de nódulos y la mayor parte ellos inactivos, se traducían en una disminución del 40 % de la actividad nitrogenasa en el caso de mutante, respecto de las plantas control (Figura 18E). Para descartar que este fenotipo aberrante de *nramp1-1*, se debiera a otra inserción de *Tnt1* en otro gen, se llevó a cabo la transformación de estos mutantes con la misma construcción usada para inmunolocalización, *MtNramp1-HA* conducido bajo su propio promotor. Las plantas *nramp1-1* transformadas con *MtNramp1-HA*, alcanzaron una recuperación casi total del fenotipo, obteniendo valores de biomasa, número de nódulos activos y actividad nitrogenasa, muy próximos a los de plantas silvestres transformadas con el plásmido vacío (Figura 18A-E). Esto

sugeriría que la alteración en el crecimiento, y en la fijación de nitrógeno en los mutantes *nramp1-1*, se debería a la mutación en el gen *MtNramp1*.

Figura 18. Fenotipo de plantas WT de *M. truncatula*, mutantes *nramp1-1* y *nramp1-1* transformadas con *MtNramp1* en condiciones simbióticas. (A) Crecimiento de plantas representativas de WT, *nramp1-1* y (*nramp1-1* NR1p::MtNramp1). Barra de escala = 1cm. (B) Nódulos representativos de cada línea. Barra de escala = 1mm. (C) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos representan la media $\pm$ ES (n=6-8 plantas). (D). Número de nódulos por planta. Los datos representan la media $\pm$ ES (n=7 plantas). (E) Actividad nitrogenasa en nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos representan la media $\pm$ ES. (F) Contenido de hierro (ppm) en plantas de 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. *indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Con el fin de saber si el fenotipo de las plantas *nramp1-1* se debía a una disminución en el aporte de hierro al nódulo, se llevaron a cabo experimentos de complementación fenotípica, aumentando la concentración de hierro en la solución nutritiva mediante la adición de Sequestrene® (Fe-EDDHA). Los mutantes *nramp1-1* que recibieron un aporte extra de hierro, presentaban un mayor número de nódulos activos, una mayor actividad nitrogenasa y un mayor peso fresco, que las plantas *nramp1-1* regadas con cantidades basales de hierro (Figura 19A-D). Por tanto, un aumento en la concentración de hierro en la solución nutritiva permitió una complementación del fenotipo *nramp1-1*, alcanzando valores comparables, incluso mayores que las plantas control. Este experimento indicaba que el fenotipo aberrante de las plantas *nramp1-1* sería debido a una disminución en el hierro que llegaría al nódulo para llevar a cabo la FSN. Los ensayos de medición de metales por ICP-MS y TXRF, confirmaron que, realmente, en los nódulos de *nramp1-1* había menos hierro que en los nódulos silvestres (Figura 18F), lo que justificaría la bajada de actividad nitrogenasa en el mutante y que ésta se recuperara con un aporte de hierro adicional. Además, las raíces de *nramp1-1* contenían una mayor cantidad de Fe, que las de las plantas control (Figura 18F).

Figura 19. Complementación con hierro del fenotipo *nramp1-1*. (A) Crecimiento de plantas representativas. Barra de escala = 1cm. (B) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=8 plantas). (C) Número de nódulos por planta. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=8-10 plantas). (D) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos son la media de $\pm$ ES.

Usando la técnica de tinción de hierro Perls-DAB mediante el método descrito por (Roschztardt et al., 2009), se logró ver donde se encontraba localizado el hierro, tanto en la raíz, como en los nódulos de plantas control y del mutante (Figura 20). No se encontraron diferencias en la distribución de hierro entre los nódulos del mutante y del silvestre, ni tampoco acúmulos de este metal debido a la mutación de *MtNramp1* (Figura 20A y B). Este resultado sugería que la diferencia de contenido de hierro en nódulo observada (Figura 13F), se debía simplemente a un menor desarrollo de la zona III en los nódulos de las plantas *nramp1-1*, ya que menos hierro disponible significa menos ferroproteínas, y por lo tanto, una menor fijación de nitrógeno. Sin embargo, las raíces noduladas de *nramp1-1* sí presentaban pequeñas acumulaciones de hierro en el apoplasto de las células del córtex, que no se apreciaban en las raíces tipo silvestre (Figura 20C-E), lo cual confirmaba el aumento de hierro en las raíces del mutante (Figura 18F).

Figura 20. Distribución de hierro en raíces y en nódulos en plantas WT y *nramp1-1*. (A) nódulos tipo silvestre (WT) y (B) *nramp1-1* de *M. truncatula*. Los paneles de la izquierda muestran secciones teñidas con azul de toluidina y azul de metileno. Las regiones encuadradas representan el área aproximada de la región que se tiñó con Perls-DAB (panel de la derecha), el cual muestra la distribución de hierro. Se indican las zonas del nódulo. (C) Distribución de hierro en raíces tipo salvaje (WT). El panel de la izquierda muestra una sección de raíz teñidas con azul de toluidina y azul de metileno, las regiones encuadradas representan el área aproximada de la región que se tiñó con Perls-DAB en panel de la derecha. (D) Distribución de hierro en raíces *nramp1-1*. El panel de la izquierda muestra una sección de raíz teñidas con azul de toluidina y azul de metileno, las regiones encuadradas representan el área aproximada de la región que se tiñó con Perls-DAB en panel de la derecha. Las puntas de flecha indican las regiones de acumulación del hierro. (E) Ampliación de la región encuadrada en el panel D. Las puntas de flecha indican los puntos de acumulación de hierro. Barras de escala, (A-C) y (D, panel izquierdo): 100µm; (D, panel derecho: 50µm; (E): 10µm.

Para determinar si el fenotipo causado por la mutación de *MtNramp1* se debería a una menor captación de hierro por las células del nódulo o a un menor aporte por los vasos desde la raíz, se llevó a cabo la complementación genética específica de nódulo de los mutantes *nramp1-1*. Para ello, se transformaron plántulas de *nramp1-1* con el gen *MtNramp1* bajo el promotor del gen *MtMATE* (*Multidrug & Toxic Compound extrusion; Medtr081400*). *MtMATE* es un gen específico de nódulo, y tiene un patrón de expresión en este órgano similar a *MtNramp1* (Figura 21 y Figura 22A).

Figura 21. Expresión de *MtMATE* en diferentes zonas del nódulo de *M. truncatula*. ZI, indica la zona I; ZII d, zona II distal (región más cercana a la zona I); ZII p, zona II proximal; IZ es la interzona entre la zona II y la zona III; ZIII, zona III. Los datos se obtuvieron de la base de datos Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>)

La expresión dirigida únicamente al nódulo de *MtNramp1* fue capaz de restablecer el crecimiento silvestre de las plantas *nramp1-1* en condiciones simbióticas (Figura 22B). Éstas plantas también tenían nódulos rosados activos igual que los de las plantas control, a diferencia de los nódulos blancos e inactivos que presentaban las plantas *nramp1-1* (Figura 22C), así como un aumento de biomasa (Figura 22D) y un aumento en el número total de nódulos (Figura 22E).

Esta complementación específica con *MtMATEp::MtNramp1*, consiguen aumentar la actividad nitrogenasa del mutante en un 85% en comparación con las plantas control (Figura 22F).

Figura 22. Complementación del fenotipo de *nramp1-1* por *MtNramp1* bajo la regulación de un promotor específico de nódulo. (A) Expresión de *Medtr6g081400*, un transportador MATE específico de nódulo, cuyo promotor regula el constructo para la complementación. RFN = raíces fertilizadas con nitrógeno; RD = raíces denoduladas; Nod = nódulos; AFN = parte aérea fertilizada con nitrógeno; AN = parte aérea nodulada. El control positivo usado es la expresión de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*. (B) Crecimiento de plantas representativas. Barra de escala = 1mm. (D) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=4 plantas). (E) Número de nódulos por planta. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=4 plantas). (F) Actividad nitrogenasa in nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos son la media de $\pm$ ES.

La complementación en levaduras indicaba que MtNramp1 es también capaz de introducir Mn^{2+} en el citosol. Para comprobar si la mutación de *MtNramp1*, tenía un efecto en la homeostasis de manganeso en *M. truncatula*, se examinó el fenotipo de *nramp1-1* en condiciones simbióticas y no simbióticas, bajo concentraciones estándar de manganeso (4,12 μM $MnSO_4$) y con ausencia de manganeso (0 μM $MnSO_4$) en la solución nutritiva de riego. No se observaron cambios significativos en el fenotipo de las plantas *nramp1-1* en condiciones no simbióticas (Figura 23) o simbióticas (Figura 24), aparte de una reducción en el contenido de manganeso en raíces *nramp1-1* en condiciones deficientes de manganeso y un aumento en la parte aérea de *nramp1-1* cuando se regó con concentraciones estándar de manganeso. (Figuras 23D y 24F).

Figura 23. Fenotipo de plantas *nramp1-1* en condiciones no simbióticas, en deficiencia de manganeso. (A) Crecimiento de plantas representativas. Barra de escala = 1cm. Las concentraciones de manganeso en la solución nutritiva usada se indican debajo. (B) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=3 plantas). (D) Contenido de manganeso en raíces y partes aéreas de plantas control (WT) y *nramp1-1* bajo dos concentraciones de manganeso diferentes. Los datos son la media $\pm$ ES de dos sets de 5 plantas cada uno. * indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 24. Fenotipo de *nramp1-1* en condiciones simbióticas bajo dos concentraciones diferentes de manganeso. (A) Crecimiento de plantas representativas. Barra de escala = 1cm. Las concentraciones de manganeso en la solución nutritiva usada se indican debajo. (B) Nódulos representativos de cada línea. Barra de escala = 1mm. (C) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=6-8 plantas). (D) Número de nódulos por planta. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=7 plantas). (E) Actividad nitrogenasa en nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos representan la media $\pm$ ES. (F) Contenido de manganeso (ppm) en plantas de 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. *indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

2. MtYSL

Hasta la fecha no se han descrito transportadores de metales en nódulo, implicados directamente, en la salida de estos metales desde el cilindro vascular, hacia el apoplasto del nódulo. Los miembros de familia de transportadores YSL, serían buenos candidatos para realizar esta función por varios motivos. En primer lugar porque estos transportadores son capaces de transportar complejos metal-NA (Conte & Walker, 2012), y esta es la forma en la que algunos metales se suelen encontrar en xilema y floema (Pich & Scholz, 1996, Rellán-Álvarez et al., 2010, Alvarez-Fernández et al., 2014); En segundo lugar, porque a menudo, en otros sistemas vegetales, los YSLs se han encontrado asociados a los vasos, interviniendo en la salida del metal desde la vasculatura, hacia los tejidos sumidero (DiDonato et al., 2004, Waters et al., 2006).

2.1. *M. truncatula* tiene 9 miembros de la familia de transportadores YSL.

Partiendo de la hipótesis de que transportadores tipo YSL, podrían estar implicados en el transporte de metales en el nódulo, se llevó a cabo el análisis del genoma de *M. truncatula*, con el fin de identificar cuántos miembros de esta familia posee. La base de datos MtDB del J. Craig Venter Institute (<http://www.jcvi.org/medicago/>), mostró que existen 9 genes, cuya secuencia los identifica como miembros de la familia YSL (*Medtr3g063490*, *Medtr5g091600*, *Medtr3g063520*, *Medtr6g077870*, *Medtr7g028250*, *Medtr1g007540*, *Medtr1g007580*, *Medtr3g092090* y *Medtr1g077840*). Todos ellos se numeraron del 1 al 9 (MtYSL1-MtYSL9), en función de grado de homología que existía con el gen que primero se descubrió de esta familia en *M. truncatula*, como resultado de un estudio de transcriptómica llevado a cabo previamente en el laboratorio y al que se le asignó el nombre de MtYSL1. Así, de mayor a menor grado de homología con este gen, se nombraron el resto.

Con el fin de saber un poco más acerca de estos 9 transportadores YSL, se llevaron a cabo análisis filogenéticos, mediante la comparación de estas secuencias, con las de otros genes YSL conocidos de especies como *A. thaliana*, *O. sativa*, *Zea mays*, como representantes de plantas que no forman simbiosis con rizobios fijadores de nitrógeno, y *Brachypodium distachyon* y *G. max* (soja), como leguminosas fijadoras de nitrógeno. El árbol resultante del análisis, mostró que existen 4 grupos filogenéticos claramente diferenciados (Figura 25).

Figura 25. Familia YSL en *M. truncatula*. Árbol filogenético de la familia de transportadores YSL en *M. truncatula*, MtYSL1-MtYSL9 (Medtr3g063490, Medtr5g091600, Medtr3g063520, Medtr6g077870, Medtr7g028250, Medtr1g007540, Medtr1g007580, Medtr3g092090 y Medtr1g077840) y los homólogos en otras especies como *A. thaliana*: AtYSL1 (At4g24120), AtYSL2 (At5g24380), AtYSL3 (At5g53550), AtYSL4 (At5g41000), AtYSL5 (At3g17650), AtYSL6 (At3g27020), AtYSL7 (At1g65730), AtYSL8 (At1g48370); *O. Sativa*: OsYSL1 (Os01g0238700), OsYSL3 (Os05g0251900), OsYSL4 (Os05g0252000); OsYSL5 (Os04g0390600), OsYSL6 (Os04g0390500); OsYSL7 (Os02g0116300), OsYSL8 (Os02g0116400), OsYSL10 (Os04g0674600), OsYSL12 (Os04g0524600), OsYSL13 (Os04g0524500), OsYSL14 (Os02g0633300); OsYSL15 (Os02g0650300), OsYSL16 (Os04g0542800); OsYSL17 (Os08g0280300), OsYSL18 (Os01g0829900); *Z. mays*: ZmYSL1 (Zm00001d017429), ZmYSL2 (Zm00001d025977), ZmYSL6 (Zm00001d003941), ZmYSL11 (Zm00001d025888), ZmYSL12 (Zm00001d025887), ZmYSL14A (Zm00001d051193), ZmYSL17 (Zm00001d054042); *B. distachyon*: BdYSL1A (BRADI_3g50267), BdYSL1B (BRADI_3g50263), BdYSL2 (BRADI_3g50260), BdYSL3 (BRADI_5g17230), BdYSL9 (BRADI_5g17210); BdYSL10 (BRADI_2g5395), BdYSL11 (BRADI_5g16190), BdYSL12 (BRADI_5g16170), BdYSL13 (BRADI_5g16160) y *G. max*: GmYSL7 (GLYMA_11G203400), GLYMA_09G164500; GLYMA_16G212900.

Poco se sabe a cerca del significado biológico de cada uno de los grupos filogenéticos. Únicamente, que el grupo IV es específico de monocotiledóneas y en el grupo I es donde más miembros se encuentran caracterizados. Entre ellos, ZmYSL1 (Beadle, 1929, Curie et al., 2001), el primer gen descrito y caracterizado de la familia y sus ortólogos en *B. distachyon* y en arroz (BdYSL1A, BdYSL1B y OsYSL15), los cuáles todos transportan Fe^{3+} -PS (NA o DMA) (Inoue et al.,

2009). En este grupo I también se encuentran AtYSL1, AtYSL2 y AtYSL3 (DiDonato et al., 2004, Waters et al., 2006). En todos los casos descritos de este grupo, los transportadores se localizan en la membrana plasmática y el sustrato a transportar es metal (hierro o cobre) unido a NA o DMA. A este grupo pertenece MtYSL8, uno de los miembros de esta familia descritos en esta Tesis Doctoral. En el grupo II se encuentran caracterizados AtYSL4 y AtYSL6 (Conte et al., 2013, Divol et al., 2013), los cuáles parecen estar localizados en membranas intracelulares. Y, por último, en el grupo III únicamente se han descrito AtYSL7 y AtYSL8 (Hofstetter et al., 2013) los cuáles se han relacionado con el transporte de un péptido (Siringolina A) secretado por *Pseudomonas syringae*. A este grupo III pertenece MtYSL1, el otro YSL descrito en esta Tesis Doctoral.

2.2. MtYSL1.

2.2.1. MtYSL1 se induce en el nódulo.

Para identificar los genes que se inducían en condiciones de nodulación, se llevaron a cabo experimentos de transcriptómica. Este experimento mostró que un gen de la familia YSL se inducía en el nódulo en comparación con la raíz fertilizada con nitrógeno. A este gen se le nombró como *MtYSL1* (*Medtr3g063490*). Para confirmar estos datos de expresión, se realizaron PCRs cuantitativas usando ADNc procedente de partes aéreas y raíces fertilizadas con nitrógeno, de partes aéreas de plantas inoculadas y raíces denoduladas y de nódulo (Figura 26). Los datos muestran un pico de expresión en nódulo, lo cual hace pensar que MtYSL1 podría tener una importante función en este órgano.

Figura 26. Expresión génica de MtYSL1. Expresión de MtYSL1 en partes aéreas (AFN) y raíces fertilizadas con nitrógeno (RFN), partes aéreas noduladas (AN), raíces denoduladas (RD) y Nódulo (Nod), relativizada al gen constitutivo de referencia de la *ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*. Los datos son la media $\pm$ ES de seis experimentos independientes.

2.2.2. MtYSL1 se localiza en la membrana de las células que rodean los vasos, y en las células del parénquima del nódulo.

Los YSLs descritos hasta la fecha en otras especies plantas, tienen dos funciones diferenciadas según su localización. Por un lado, están los implicados en la captación de metales directamente desde el suelo (Conte & Walker 2012). Se han descrito sobre todo en gramíneas y debido a esta función, estos transportadores se suelen localizar en las células epidérmicas de la raíz, por ejemplo, OsYSL15 (Inoue et al., 2009). Por otro lado, están los implicados en el transporte a larga distancia. Debido a esta función se encuentran a menudo alrededor del cilindro vascular de la raíz, o alrededor de los haces vasculares de órganos fuente y/o sumidero, como, por ejemplo, AtYSL1, AtYSL2 y AtYSL3 (Waters et al., 2006, DiDonato et al., 2004).

Los experimentos de PCR cuantitativa mostraron que MtYSL1 se expresa tanto en raíz como en nódulo (Figura 27). Para determinar en qué tejidos de estos dos órganos se expresa este gen, se transformaron plantas de *M. truncatula* con un vector que contiene 2Kb de la región promotora de MtYSL1 fusionadas al gen de la β -glucuronidasa. Tras la inoculación con *S. meliloti* y tras 28 dpi, la actividad GUS se detectó tanto en raíces como en la mayor parte del nódulo, a excepción de la zona I (Figura 19A). Las secciones de ambos órganos, permitió una mayor resolución de la localización tisular. En cortes longitudinales de nódulo, la señal GUS se detectó a lo largo de toda la zona II y toda la zona III, coincidiendo con en el parénquima del nódulo y en torno a los haces vasculares (Figura 27B). Para saber si la expresión de *MtYSL1* era en torno a los vasos, se realizó un corte transversal de nódulo. Éste mostró que *MtYSL1* se expresaba alrededor de toda la periferia del nódulo, no sólo alrededor de los haces vasculares, sino también en las células no infectadas del parénquima (Figura 27C). Para determinar el tejido específico en el que *MtYSL1* se expresa en la raíz, se realizaron cortes transversales, que mostraron que *MtYSL1* se transcribe en una línea de células que rodea el haz vascular, endodermis o periciclo, y en determinadas células que rodean al xilema (Figura 27D).

Figura 27. Localización tisular de MtYSL1. (A) Detección de la actividad GUS en raíces y en nódulos de plantas de *M. truncatula* transformadas con el plásmido pGWB3 que con tiene la fusión con el del promotor de *MtYSL1::gus*. (B) Sección longitudinal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que con tiene la fusión con el del promotor de *MtYSL1::gus*. (C) Sección transversal de un nódulo de *M. truncatula* con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que con tiene la fusión con el del promotor de *MtYSL1::gus*. (D) Sección transversal de una raíz con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que con tiene la fusión con el del promotor de *MtYSL1::gus*. (HV: haz vascular; End: endodermis; Córtex). Barra de escala (A): 1mm; (B y C): 200µm; (D): 100µm.

Para determinar la localización subcelular de MtYSL1 y confirmar la localización tisular de los ensayos de GUS, se recurrió a la técnica de inmunolocalización y microscopía confocal (Figura 28). Para llevar a cabo estos experimentos se fusionó el promotor nativo al gen *MtYSL1* completo (intrones y exones), con tres epítopos de HA en el extremo C-terminal, mediante su clonación en el vector pGWB13. Tras la transformación de las plántulas de *M. truncatula* con la construcción *MtYSL1-HA*, y posterior inoculación con *S. meliloti* que expresaba GFP, se recogieron muestras de raíces y nódulos de 28 dpi. Tras su fijación se procedió a la inmunodetección del epítipo MtYSL1-HA, usando un anticuerpo primario anti-HA producido en ratón y un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa 594 (rojo). El ADN se tiñió con DAPI (azul) (Figura 28).

A

B

C

Figura 28. Localización subcelular de MtYSL1. (A) Sección longitudinal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* transformado con MtYSL1-HA e infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde, panel superior en medio). El ADN se tiñó con DAPI (azul, panel superior izquierdo). La localización de MtYSL1-HA se determinó usando un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo, panel superior derecha). Estas 3 imágenes se superpusieron entre sí (panel inferior en medio), y también con la imagen del nódulo en transiluminación (paneles, inferior izquierdo y derecho). (B) Vista en detalle del cuadro indicado en la imagen A. El panel izquierdo muestra la superposición de la localización de *S. meliloti* (verde) y los núcleos celulares (azul), el panel central muestra la localización de MtYSL1-HA marcado con Alexa 594 (rojo). El panel de la derecha muestra la superposición del panel izquierdo y central. Las flechas indican la Banda de Caspary. (C) Corte transversal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* transformado con MtYSL1-HA. En el panel izquierdo muestra la superposición de la localización de *S. meliloti* (verde) y el núcleo de las células teñidos con DAPI. El panel central muestra la señal del anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa 594. El panel derecho muestra la superposición de las dos imágenes anteriores junto con la imagen de transiluminación. Barras de escala (A): 200µm; (B): 50µm; (C): 200µm.

Estos experimentos de inmunolocalización confirmaron los datos de localización tisular de GUS, ya que la señal de MtYSL1-HA Alexa 594 (rojo) se detectó en zona II y III a los lados del nódulo (Figura 28A). Con un mayor aumento se observa que MtYSL1 se encuentra en la membrana plasmática de las células que rodean los vasos, concretamente en la endodermis del vaso del nódulo, ya que estas células tienen banda de Caspary (Figura 28B, flechas blancas). También se localiza en las células no infectadas que rodean los vasos y que forman parte del parénquima del nódulo. Por tanto, como también mostraban los ensayos de GUS, MtYSL1 se encuentra localizado, no sólo en torno a los vasos, sino también en las células que no contienen rizobios y que se encuentran formando el parénquima del nódulo (Figura 28C).

Para determinar la localización subcelular de MtYSL1 en raíces, también se llevó a cabo la inmunodetección del epítipo HA de MtYSL1-HA, mediante el anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo), pero en este caso en cortes transversales de raíz. Los ensayos de GUS mostraban que, en raíz, MtYSL1 se expresaba en una capa de células que rodeaba el cilindro vascular que podría ser endodermis o periciclo (Figura 29A). Para discernir entre ambas, se llevó a cabo la tinción de la banda de Caspary con azul de berberina. La tinción permitió indicar que MtYSL1 se localizaba en las células del periciclo, ya que la señal de Alexa 594 (MtYSL1-HA) se encontraba en la periferia de las células que hay en una zona inmediatamente interior a la endodermis (Figura 29B).

Figura 29. Localización de MtYSL1 en raíz. (A) Imagen de microscopía confocal con la localización de MtYSL1-HA en una sección transversal de raíces de 28dpi de *M. truncatula*. La posición de MtYSL1 se determinó usando un anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo, panel derecho). El panel izquierdo es la superposición del panel derecho junto con la imagen de transiluminación de la raíz. (B) Detalle de la imagen A (panel izquierdo). El panel central, es la tinción de la banda de Caspary con berberina y la imagen de transiluminación. En el panel de la derecha se muestra la superposición de las imágenes izquierda y central (End = endodermis). Barra de escala (A): 50µm; (B): 10µm.

Con el fin de verificar si el transportador MtYSL1 se localiza en la membrana plasmática de todos estos tipos celulares del nódulo y de la raíz, se llevó a cabo una co-agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con la secuencia codificante del gen *MtYSL1* fusionada a GFP en posición N-terminal, bajo el promotor constitutivo 35S, y un marcador de membrana plasmática (AtPIP2) fusionado a CFP. Tras 48 horas, se observó la fluorescencia de ambas proteínas fluorescentes en microscopio confocal. La señal de GFP de MtYSL1 (verde) co-localizaba con la señal del marcador de membrana plasmática AtPIP2 (cian). Esto indicaba que MtYSL1 está localizado en la membrana plasmática (Figura 30).

Figura 30. Co-Localización de MtYSL1 y AtPIP2 en hojas epidérmicas de *N. benthamiana*. Panel izquierdo: localización de MtYSL1::GFP (verde); panel central, localización de la proteína de membrana plasmática AtPIP2 (cian) y en el panel derecho se encuentran la superposición de las dos imágenes anteriores y la imagen de transiluminación. Barra de escala 50μm.

2.2.3. MtYSL1 no transporta metal-NA en *Saccharomyces cerevisiae*.

La mayor parte de los YSLs caracterizados en diferentes especies se han asociado con el transporte de metal-fitosideróforo (NA o DMA) (Conte & Walker, 2012). Por este motivo, para saber cuál es el sustrato que transporta MtYSL1, se recurrió a experimentos de complementación heteróloga en mutantes de *S. cerevisiae* en el transporte de metales, donde la única fuente de metal externa era la que formaba el complejo con NA. No se realizaron experimentos con DMA, puesto que estos fitosideróforos son característicos de especies de plantas monocotiledóneas (Conte & Walker, 2012).

Para estos ensayos se usó un sistema de dos plásmidos con promotores inducibles. En el plásmido pYES6CT_rfA se clonó la secuencia codificante de MtYSL1 bajo un promotor inducible de levadura (GAL1). El otro plásmido (pGEV) era el responsable de la inducción del primero mediante la presencia en el medio del inductor β -estradiol (BE) (Gao & Pinkham, 2000). Las levaduras mutantes en el transporte de hierro (*fet3fet4*), cobre (*ctr1*) y zinc (*zrt1zrt2*) se transformaron con ambos plásmidos (Chu et al., 2010). La primera cepa de levadura fue la misma que se usó para los ensayos de MtNramp1; la segunda, se trata de una levadura mutante en un transportador de cobre de alta afinidad ScCTR1 que introduce cobre en el citosol. Esta cepa *ctr1* carece de su sistema principal de captación de cobre desde el exterior (Dancis et al., 1994), lo que hace que, todas las reacciones metabólicas que implican al cobre como cofactor, se vean afectadas en *ctr1*, entre ellas, la respiración oxidativa. Para que ésta pueda llevarse a cabo, es necesaria la acción de la enzima citocromo c oxidasa, siendo el cobre el cofactor esencial de

esta enzima. Esto hecho provoca que la cepa *ctr1*, sea capaz de crecer sólo en presencia de glucosa, y no en presencia de fuentes de carbono no fermentables, como el glicerol. Por ello, el crecimiento de la cepa *ctr1* en un medio donde la única fuente de carbono es el glicerol, sólo sería posible sustituyendo la función de ScCTR1 por la de otro transportador capaz de introducir cobre en el citoplasma. Por último, la levadura *zrt1zrt2*, tiene mutados dos genes que codifican los transportadores de zinc, *ScZRT1* y *ScZRT2*, uno de alta y otro de baja afinidad, que introducen zinc en el citosol (Zhao & Eide, 1996a, Zhao & Eide, 1996b), por lo que esta cepa es incapaz de crecer bajo condiciones de baja concentraciones de zinc.

La expresión heteróloga de MtYSL1 en las levaduras *ctr1*, *zrt1zrt2* y *fet3fet4*, no logró revertir el fenotipo en ninguno de los casos (Figura 31A-D). Es decir, MtYSL1 no fue capaz de introducir Cu^+ ó Cu^+ -NA (Figura 31A), Zn^{2+} ó Zn^{2+} -NA (Figura 31B), Fe^{2+} ó Fe^{2+} -NA (Figura 31C), Fe^{3+} o Fe^{3+} -NA (Figura 31D), respectivamente, en el citosol, para restaurar el crecimiento de cada una de las levaduras mutantes. Por lo tanto, al menos usando *S. cerevisiae* como sistema heterólogo, no se pudo demostrar el transporte de metales libres o unidos a NA por parte de MtYSL1.

Figura 31. Ensayo de transporte de metal-NA por complementación en levaduras. (A) Transporte de cobre. La cepa de levadura BY4741 se transformó con pGEV y con el plásmido vacío pYES6CT, y la cepa mutante *ctr1*, transformó también con pGEV y con pYES6CT vacío o con las construcciones ScCTR1::pYES6CT y MtYSL1::pYES6CT. Se hicieron diluciones seriadas (10x), de cada uno de los transformantes y se crecieron de 3 a 5 días a 30°C en medio no selectivo como control positivo (SD-glucosa) y en medio selectivo (SDG -glicerol), con 1μM CuSO₄, sin y con inductor BE o con el complejo CuSO₄-NA, en ausencia y presencia de BE. Concentración NA=10μM y BE=10nM. (B) Transporte de zinc. La cepa de *S. cerevisiae* DY1417, se transformó con pGEV y con el plásmido vacío pYES6CT, y la cepa mutante *zrt1zrt2*, se transformó también con pGEV y con pYES6CT vacío o con MtYSL1::pYES6CT. Se hicieron diluciones seriadas (10x), de cada uno de los transformantes y se crecieron de 3 a 5 días a 30°C en medio SD, con altas concentraciones de ZnSO₄ (control positivo), o con 1.4μM ZnSO₄, sin y con inductor BE o con el complejo ZnSO₄-NA, en ausencia y presencia de BE. Concentración NA=10μM y BE=10nM. (C) Transporte de hierro Fe²⁺. La cepa de levadura DY1451 se transformó con pGEV y con el plásmido vacío pYES6CT, y la cepa mutante *fet3fet4*, transformó también con pGEV y con pYES6CT vacío o con MtYSL1::pYES6CT. Se hicieron diluciones seriadas (10x), de cada uno de los transformantes y se crecieron de 3 a 5 días a 30°C en medio SD con altas concentraciones de hierro (50mM FeCl₃), o con 3μM FeSO₄, sin y con inductor BE o con el complejo FeSO₄-NA, en ausencia y presencia de BE. Todas las placas con FeSO₄, llevan adicionado 1mM de ácido ascórbico para evitar su oxidación. Concentración NA=8μM y BE=10nM. (D) Transporte de hierro Fe³⁺. La cepa de levadura DY1451 se transformó con pGEV y con el plásmido vacío pYES6CT, y la cepa mutante *fet3fet4*, transformó también con pGEV y con pYES6CT vacío o con MtYSL1::pYES6CT. Se hicieron diluciones seriadas (10x), de cada uno de los transformantes y se crecieron de 3 a 5 días a 30°C en medio SD con altas concentraciones de hierro (50mM FeCl₃), o con 10μM FeCl₃, sin y con inductor BE o con el complejo FeSO₄-NA, en ausencia y presencia de BE. Concentración NA=15μM y BE=40nM.

Dado que este ensayo en levaduras no sirvió determinar el transporte de metales por MtYSL1, se decidió recurrir a otro sistema heterólogo con el fin de poder descartar si éste es un transportador de metales o no. Para ello se usó el doble mutante de *A. thaliana ysl1ysl3*, el cuál presenta una inserción en AtYSL1, el cuál es capaz de transportar Fe²⁺-NA, y en AtYSL3, el cuál es capaz de transportar tanto Fe²⁺-NA, como Fe³⁺-DMA (Chu et al., 2010). Ambas mutaciones provocan alteraciones en la homeostasis de hierro, lo que hace que, éstas plantas presenten clorosis intervenal en las hojas de la roseta y defectos en la producción de semillas (Waters et al., 2006). Para llevar a cabo este ensayo, se transformaron plantas de *ysl1ysl3* con la secuencia codificante de MtYSL1 bajo un promotor 35S. Sin embargo, las plantas transformadas continuaban presentando la misma clorosis intervenal, incluso más pronunciada que las plantas *ysl1ysl3* no transformadas (Figura 32). Esto quiere decir que, MtYSL1 no fue capaz de subsanar la alteración de la homeostasis de Fe en el mutante, y restaurar así el fenotipo del mismo. Por lo tanto, con este otro sistema, tampoco se pudo comprobar si MtYSL1 es un transportador de hierro.

Figura 32. Ensayo de transporte de hierro en *Atysl1ysl3*. Las plantas *Atysl1ysl3* se transformaron con la secuencia codificante de MtYSL1 en el vector pGWB2 (bajo un promotor 35S). Las semillas de Col-0 (WT) y del mutante *Atysl1ysl3* se plaquearon en medio MS. Las semillas de los transformantes de *Atysl1ysl3::MtYSL1* se plaquearon en MS + 50µg/ml de kanamicina para seleccionar las semillas transformadas. Las placas se incubaron durante 15 días.

2.2.4. MtYSL1 es capaz de transportar péptidos de entre 4 y 6 aminoácidos.

Los YSLs pertenecen a la gran superfamilia de transportadores OPTs (Yen et al., 2001, Lubkowitz, 2011). De estos últimos se han descrito algunos miembros, cuya función se asocia con la homeostasis de metales en plantas, como AtOPT3, un transportador localizado en el floema, cuya función se ha asociado con la distribución de hierro a lo largo de la planta (Zhai et al., 2014). Sin embargo, también se han descrito OPTs en plantas, como transportadores de péptidos, y de glutatión (GSH) (Koh et al., 2002, Cagnac et al., 2004). Este es el caso de AtOPT4 y AtOPT6. El primero, inicialmente se describió como un transportador de péptidos de leucina de entre 4 y 5 aminoácidos (Koh et al., 2002), y recientemente también se ha comprobado su capacidad de transportar GSH (Zhang et al., 2016). AtOPT6 también ha mostrado capacidad de transportar este tripéptido (Cagnac et al., 2004). El GSH tiene una importante función en todas las plantas, formando parte de los sistemas de defensa antioxidante, frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Apel & Hirt, 2004). En la simbiosis rizobio-leguminosa, existen varios procesos que hacen que la producción de estas ROS se vea incrementada, como en las primeras etapas de infección (Oldroyd et al., 2011), y dentro de los nódulos activos, debido a las altas tasas de respiración necesarias para que la nitrogenasa lleve a cabo su función (Becana et al., 2010). Todo ello, ha hecho que la síntesis de GSH sea esencial para el desarrollo adecuado de los nódulos (Pauly et al., 2006).

Por tanto, ya que hay OPTs implicados en el transporte de GSH, y éste es importante en la simbiosis rizobio-leguminosa, se evaluó si MtYSL1 podría funcionar como transportador de GSH. Para ello se llevaron a cabo experimentos de complementación en levaduras mutantes en un

transportador de glutatión HGT1 (*hgt1*). Para este experimento se transformaron la levadura tipo silvestre ABC733, con el plásmido de levaduras pDR196 vacío y la levadura mutante ABC817 (*hgt1*), tanto con el plásmido vacío, como con la secuencia codificante de MtYSL1. En presencia de 3 concentraciones de diferentes de GSH, MtYSL1 no fue capaz de restaurar el crecimiento de la levadura mutante *hgt1* (Figura 33).

Figura 33. Ensayo del transporte de GSH por MtYSL1. La cepa de levadura tipo salvaje ABC733 se transformó con el plásmido vacío pDR196, y la cepa mutante ABC817 (*hgt1*) se transformó con el mismo plásmido vacío y con el plásmido conteniendo la CDS de MtYSL1. Se hicieron diluciones seriadas (10x) de cada uno de los transformantes y se crecieron de 2 a 3 días a 30°C en medio SD con todos los aminoácidos requeridos (control positivo), en SD -S (sin sulfato amónico) con metionina como fuente de azufre (control positivo), o en SD (-S) sin metionina y en concentraciones crecientes de GSH (25, 50 y 100μM).

Hay transportadores OPT y YSL que se han asociado con el transporte de péptidos que no son GSH. Este es el caso de AtOPT4 (Koh et al., 2002) o de AtYSL7. De este último se ha descrito su capacidad de transportar Siringolina A, un factor de virulencia que es secretado por *P. syringae* (Hofstetter et al., 2013). Teniendo este trabajo como premisa, y sabiendo que MtYSL1, está muy próximo en el árbol filogenético a AtYSL7 (Figura 25), sería posible que MtYSL1 fuera capaz de transportar otros péptidos que no fueran GSH. Para realizar estos experimentos se usó la cepa de levadura BY4742 mutante en ScOPT1 (*opt1*), que se transformó o bien con el plásmido vacío o con otro que expresaba *MtYSL1*. Además, se usaron como controles transformantes que expresaban *AtOPT4* o *AtYSL7*, ya que estaban caracterizados como transportadores de otros péptidos. Todos los transformantes se crecieron en presencia de diferentes péptidos, de entre 4 y 12 aminoácidos. Estos ensayos pusieron de manifiesto que, MtYSL1 es capaz de transportar péptidos de entre 4 y 6 aminoácidos, al igual que AtYSL7 (Figura 34). Los péptidos más grandes

de 8, 10 y 15 aminoácidos, no pudieron ser transportados por MtYSL1 ni AtYSL7 en este sistema, ya que no fueron capaces de restaurar el fenotipo de la levadura mutante (Figura 34). Estos resultados sugieren que, MtYSL1 podría tener un papel en el transporte de péptidos pequeños en planta.

Figura 34. Ensayo transporte de péptidos por MtYSL1. La cepa de levadura BY4742 mutante *opt1* se transformó con el plásmido pDR196 y con ese mismo plásmido conteniendo la CDS de MtYSL1, AtOPT4 y AtYSL7. Se hicieron diluciones seriadas (10x) de cada uno de los transformantes y se crecieron de 5 a 10 días a 30°C en medio SD con cloruro amónico como fuente de nitrógeno (control positivo), o con los péptidos ALAL, LSKL, IIGLM, KLLLLG, DRVYIHPF, DRVYIHPFHL o RLAPGPDPHHN, como única fuente de nitrógeno.

2.2.5. La mutación de MtYSL1 provoca una disminución en la actividad nitrogenasa.

Con el objetivo de estudiar si MtYSL1 tiene un papel en la FSN, se obtuvieron líneas mutantes mediante la inserción de *Tnt1*, procedentes de la colección de mutantes de la Samuel Roberts Noble Foundation (Tadege et al., 2008). Concretamente se consiguieron dos líneas mutantes. La primera, NF11536 (*ysl1-1*) tenía la inserción del transposón en la posición +1118 del primer intrón; y la segunda, NF9504 (*ysl1-2*) tenía la *Tnt1* en la posición +315 del primer exón del gen MtYSL1 (Figura 35A). Tras el genotipado de las plantas segregantes, se obtuvieron las líneas homocigotas *ysl1-1* y *ysl1-2*. Mediante PCR semicuantitativa se detectó la cantidad de transcrito de MtYSL1 en nódulos, de ambas líneas mutantes. En *ysl1-1* apareció una cantidad de transcrito menor que en nódulos silvestres, lo que parece indicar se trata de una línea donde el grado de silenciamiento del gen no es del 100% (línea *knock down*) (Figura 35B). Por el contrario, en la línea *ysl1-2*, no hay señales del transcrito de MtYSL1, lo que indica una pérdida total de la función de ese gen en estos mutantes (línea *Knock out*) (Figura 35B).

A

B

Figura 35. Líneas mutantes por la inserción de *Tnt1* en *MtYSL1*. (A) Posición del lugar de inserción de *Tnt1* en el gen *MtYSL1* para dar lugar a los mutantes *ysl1-1* (NF11536) y *ysl1-2* (NF9504). (B) Expresión por RT-PCR de *MtYSL1* en nódulos de *M. truncatula* de 28dpi control (WT), y nódulos *ysl1-1* y *ysl1-2*. Control positivo, expresión de la *Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*.

Al igual que ocurría con *MtNramp1*, dado que, *MtYSL1* se expresa en plantas noduladas y en plantas fertilizadas (Figura 26), el fenotipo de las plantas mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2* se evaluó en ambas condiciones.

Para evaluar el fenotipo de ambas líneas mutantes en condiciones simbióticas, las plantas silvestres (WT), *ysl1-1* y *ysl1-2* se crecieron previamente inoculadas con *S. meliloti* 2011, de forma que la única fuente de nitrógeno asimilable para la planta, es la proporcionada por la fijación de la bacteria. Después de 28 dpi, los mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2* mostraron un menor crecimiento (Figura 36A), que se traducía en un descenso del 50 % de peso seco, en la parte aérea de ambas líneas mutantes, respecto del WT (Figura 36E). En cuanto a la raíz, también había una disminución de peso seco, el mutante *ysl1-1* presentaba una disminución del 31 %, y *ysl1-2* una disminución del 40 % en el peso seco de la raíz, respecto a las plantas control (Figura 36E). A pesar de no existir diferencias en el tipo de nódulos de las tres líneas de plantas estudiadas, todas ellas tenían nódulos rosas y activos (Figura 36C), la capacidad de fijación de nitrógeno era de un 60 % menor en las plantas mutantes que en las plantas de tipo silvestre

(Figura 36B). En cuanto al número de nódulos por planta, no resultó haber diferencias significativas entre la línea *ysl1-1* y el WT, pero sí había diferencias de un 50 % entre la línea *ysl1-2* y las plantas control (Figura 36D). Con todos estos resultados en dos líneas mutantes diferentes, se pudo confirmar que, MtYSL1 tiene una función importante en plantas que se encuentra en simbiosis, ya que, que los mutantes presentan un fenotipo diferente a las plantas control.

Figura 36. Fenotipo de plantas WT y mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2* en condiciones no simbióticas. (A) Crecimiento de plantas representativas control (W) y mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2*. Barra de escala = 3cm. (B) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos representan la media de $\pm$ ES (n=10 plantas). (C) Contenido de clorofila. Los datos representan la media de $\pm$ ES (n=4 plantas).

Para comprobar si el fenotipo observado en las plantas mutantes bajo condiciones de simbiosis, se debe a la función de MtYSL1 en raíz o en nódulo, se estudió el comportamiento de estas plantas en condiciones no simbióticas. Aunque MtYSL1 se induce más en nódulo, éste también se expresa tanto en raíces de plantas fertilizadas con nitrato amónico como en raíces noduladas (Figura 26), por lo que se tendrá que comprobar si el fenotipo observado es debido a la ausencia de MtYSL1 en la raíz o en el nódulo. Para ello, plantas silvestres y mutantes en *MtYSL1* se crecieron en presencia de nitrato amónico en la solución de riego como única fuente de nitrógeno asimilable. Tras 28 días de crecimiento, las plantas mutantes presentaban un menor desarrollo de crecimiento que las plantas control (Figura 37A), lo que se traducía en un descenso en el peso seco de alrededor del 45 % en partes aéreas de ambos mutantes, y un descenso de en torno al 35 % en las raíces (Figura 37B).

Figura 37. Fenotipo de plantas WT y mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2* en condiciones simbióticas. (A) Crecimiento de una de las plantas representativas de WT, *ysl1-1* y *ysl1-2*. Barra de escala = 3cm. (B) Nódulos representativos de cada línea. Barra de escala = 1cm. (C) Actividad nitrogenasa en nódulo de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado en 2 sets de un grupo de 4-6 plantas cada uno. Los datos representan la media $\pm$ ES. (D) Número de nódulo por planta. Los datos representan la media $\pm$ ES (n=8-10 plantas). (E) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos representan la media de $\pm$ ES (n=8-10 plantas).

Con el fin de comprobar si el fenotipo observado en los mutantes *ysl1*, se debe a la alteración en la homeostasis de algún metal de interés para la FSN, se llevó a cabo la medición del contenido de metales por ICP-MS en plantas control y en plantas *knock out ysl1-2* en condiciones simbióticas (Figura 38).

Figura 38. Contenido de metales en plantas control y mutantes *ysl1-2*. (A) Contenido de hierro (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. (B) Contenido de cobre (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. (C) Contenido de zinc (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno.

El mutante *ysl1-2* presentaba aproximadamente el doble de hierro que las plantas control en partes aéreas y en raíces (Figura 38A). También presentaban un 26 % más hierro los nódulos mutantes que los de las plantas control (Figura 38A). En cuanto al cobre, las plantas

ysl1-2 presentaban un 67 % y un 31 % más en partes aéreas y nódulos respectivamente, respecto a las plantas tipo silvestre, no encontrándose diferencias significativas en raíces (Figura 38B). También mostraron diferencias las plantas mutantes y las plantas control en cuanto al contenido de zinc, presentando las primeras un 73 % y un 50 % más zinc en nódulos y en raíces respectivamente. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de zinc en partes aéreas (Figura 38C).

Dado que los mutantes *ysl1-2* presentaban alteraciones en los niveles de hierro en todas las partes de la planta, se evaluó su fenotipo en condiciones de deficiencia de hierro (0 mg/ml) y de exceso de hierro (Sequestrene® Fe-EDDHA 0,5 g/l). Los mutantes *ysl1-2* no veían agravado su fenotipo en condiciones de deficiencia de hierro (Figura 39A), ya que sus valores en cuanto a actividad nitrogenasa y a pesos secos, eran similares a los que presentaba en condiciones de concentración de hierro óptimas (Figura 39B-C). Además, cuando se adicionaba hierro en exceso, éste no fue capaz de restaurar el fenotipo mutante *ysl1-2*, ya que bajo estas condiciones, *ysl1-2* presentaba una actividad nitrogenasa y unos pesos secos comparables con los que mostraba en condiciones normales de hierro (Figura 39A-C).

Figura 39. Fenotipo de *ysl1-2* en condiciones de deficiencia y exceso de hierro. (A) Crecimiento de plantas representativas en deficiencia de hierro (0 mg/ml) en condiciones óptimas de hierro (Solución Jensen) y con exceso de hierro (Fe-EDDHA 0,5 g/l). Barra de escala = 3cm. (B) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos son la media de $\pm$ ES. (C) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=8-12 plantas).

Aunque los mutantes de MtYSL1 no presentaban cambios en cuanto al contenido de cobre en las raíces, estas plantas mostraban un mayor contenido de cobre tanto en partes aéreas como en nódulos (Figura 38B). Por ellos, se estudió el fenotipo de las plantas *ysl1-2* en condiciones de deficiencia de cobre (0 μ M CuSO₄) y en presencia de una solución cuya concentración de cobre estaba incrementada 10 veces (1,6 μ M CuSO₄) respecto a las concentraciones estándar de este metal (0,16 μ M CuSO₄) (Figura 40).

Figura 40. Fenotipo de *ysl1-2* en condiciones de deficiencia y exceso de cobre. (A) Crecimiento de plantas representativas en deficiencia de cobre (0 μ M) en condiciones óptimas de cobre (Solución Jensen 0,16 μ M) y con exceso de cobre (1,6 μ M). Barra de escala = 3cm. (B) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos son la media de $\pm$ ES. (C) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES (n=3-5 plantas).

Los resultados parecían indicar que, en ausencia de cobre, las plantas mutantes *ysl1-2* restauraban parcialmente su deficiencia en las capacidades de fijación de nitrógeno (Figura 40B), aunque esto no se veía reflejado en una mejora en el crecimiento vegetativo de las plantas (Figura 40 A y C). Sin embargo, un aumento en la concentración de cobre en la solución de riego, no restauraba el fenotipo de las plantas mutantes, sino que, éstas presentaban una ligera bajada en la actividad nitrogenasa respecto a las plantas crecidas en concentraciones estándar de cobre (Figura 40B).

La concentración de zinc en el nódulo es una de las que más se veía incrementada en las plantas mutantes *ysl1-2* (Figura 38C). Por tanto, se llevaron a cabo experimentos de complementación del mutante con una solución de zinc 100 veces más concentrada ($38 \mu\text{M ZnSO}_4$) que la solución estándar ($0,38 \mu\text{M ZnSO}_4$), y condiciones de deficiencia de zinc ($0 \mu\text{M ZnSO}_4$) para ver cómo afectaban al fenotipo del mutante (Figura 41).

Figura 41. Fenotipo de *ysl1-2* en condiciones de deficiencia y exceso de zinc. (A) Crecimiento de plantas representativas en deficiencia de zinc ($0 \mu\text{M}$) en condiciones óptimas de zinc (Solución Jensen $0,38 \mu\text{M}$) y con exceso de zinc ($38 \mu\text{M}$). Barra de escala = 3cm. (B) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado con 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. Los datos son la media de $\pm$ ES. (C) Peso fresco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media de $\pm$ ES ($n=3-5$ plantas).

Viendo el crecimiento de las plantas *ys1-2* todo parecía indicar que la deficiencia de zinc mejoraba el porte de la planta, mientras que un exceso de zinc lo empeoraba (Figura 41A y C). En cuanto a la capacidad de fijar nitrógeno, las plantas mutantes en deficiencia de zinc presentaban un leve incremento en la actividad nitrogenasa, pero en exceso de zinc, éstas no mostraban cambios respecto a las plantas *ys1-2* crecidas en condiciones estándar (Figura 41B).

2.3. MtYSL8

2.3.1. MtYSL8 presenta una alta expresión en los nódulos de *M. truncatula*.

Primero se llevó a cabo el análisis de expresión de MtYSL8 en planta completa mediante PCR cuantitativa (Figura 42). Los datos mostraron que, además de tener la máxima expresión en el nódulo, éste se expresa en toda la planta, raíces y partes aéreas, en condiciones de simbiosis y en condiciones no simbióticas.

Figura 42. Expresión génica de MtYSL8. Expresión de MtYSL8 en partes aéreas (AFN) y raíces fertilizadas con nitrógeno (RFN), partes aéreas noduladas (AN), raíces denoduladas (RD) y Nódulo (Nod), relativizada al gen constitutivo de referencia de la *ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa*. Los datos son la media ± ES de seis experimentos independientes.

2.3.2. MtYSL8 se localiza alrededor de los haces vasculares del nódulo.

Con el objetivo de comprobar si MtYSL8 podría estar funcionando como el transportador encargado de sacar los metales del cilindro vascular hacia el interior del nódulo, el primer paso, después de saber que se tiene una alta expresión en el nódulo, era el de saber dónde se localiza. Para ello, como se hizo con los otros dos transportadores, se llevó a cabo la fusión de 2kb del promotor de MtYSL8 y el gen de la β -glucuronidasa (*gus*). Tras la transformación de plántulas de

M. truncatula con esta construcción, y posterior inoculación con *S. meliloti* 2011, se vio si existía actividad GUS a los 28dpi (Figura 43).

Figura 43. Localización tisular de MtYSL8 en raíces y nódulos. (A) Detección de la actividad GUS en raíces y nódulos de *M. truncatula* transformadas con el plásmido pGWB3 que contiene la fusión del promotor de *MtYSL8:gus*. (B) Sección longitudinal de un nódulo con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que contiene la fusión del promotor de *MtYSL8:gus*. (C) Sección transversal de un nódulo con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que contiene la fusión del promotor de *MtYSL8:gus*. (D) Sección transversal de una raíz con actividad GUS, transformado con el plásmido pGWB3 que contiene la fusión del promotor de *MtYSL8:gus* (HV: haz vascular; End: endodermis; Córtex; Epi: epidermis). Barras de escala (A): 500µm; (B) y (C): 200µm; (D): 50µm.

La actividad GUS se detectó en nódulos, muy restringida a los haces vasculares (Figura 43A). También se intuía una expresión en raíz, como hacían indicar los resultados previos de PCR cuantitativa. Para conocer la localización tisular más en detalle, se realizaron cortes longitudinales y transversales de nódulos, y cortes transversales de raíz. La sección longitudinal de nódulo mostró que existía actividad GUS alrededor de los vasos, a todo lo largo, desde la zona I, hasta la zona III (Figura 43B). En las secciones transversales de nódulo se confirmaba, que *MtYSL8* se expresaba rodeando en su totalidad los haces vasculares, estando así su expresión restringida a estos tejidos del nódulo (Figura 43C). En raíz, la localización tisular de la expresión

de *MtYSL8* se encontraba relegada al cilindro vascular, donde se observaba una mayor intensidad de GUS alrededor del xilema y una actividad algo menor en unas células que rodean el cilindro vascular, que podrían ser periciclo o endodermis (Figura 43D).

Al igual que en los dos casos anteriores, para la determinación de la localización subcelular de MtYSL8 se recurrió a la inmunolocalización junto con la microscopía confocal (Figura 44). Para ello, se fusionó el promotor y el gen completo (intrones exones) de *MtYSL8* al epítipo HA en el extremo C- terminal. Se transformaron plántulas de *M. truncatula* y se inocularon posteriormente con el rizobio *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde). Tras recogida del material 28 dpi y su posterior fijación, se llevó a cabo la inmunolocalización del epítipo MtYSL8-HA con un anticuerpo primario anti-HA, y un secundario que llevaba conjugado el fluoróforo Alexa 594 (rojo). El ADN de las células y el bacteriano se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes tomadas con microscopio confocal confirmaron la localización tisular de GUS, MtYSL8 se localiza a todo lo largo del nódulo en torno al haz vascular (Figura 44A). En los cortes transversales, la señal de Alexa 594, parecía no restringirse sólo a los vasos, sino que también las células adyacentes, entre haces vasculares, presentaban señal del fluoróforo (Figura 44B). Con un mayor aumento de uno de los vasos, se pudo ver más en detalle que, MtYSL8 se localizaba en las células de la endodermis del vaso, dado que, la señal de roja de MtYSL8-HA co-localizaba con la banda de Caspary (en azul, por autofluorescencia). MtYSL8-HA también se detectó en las células no infectadas a ambos lados del vaso (Figura 44C).

Figura 44. Localización subcelular de MtYSL8-HA. (A) Sección longitudinal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* transformado con MtYSL8-HA e infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde, panel superior central). El ADN se tiñó con DAPI (azul, panel superior izquierdo). La localización de MtYSL8-HA se determinó usando un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo, panel superior derecho). Estas 3 imágenes se superpusieron entre sí (panel inferior central), y también con la imagen del nódulo en transiluminación (paneles, inferior izquierdo y derecho). (B) Corte transversal de un nódulo de 28dpi de *M. truncatula* transformado con MtYSL8-HA. En el panel izquierdo muestra la superposición de la localización de *S. meliloti* (verde) y el núcleo de las células teñidos con DAPI. El panel central muestra la señal del anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa 594. El panel derecho muestra la superposición de las dos imágenes anteriores junto con la imagen de transiluminación. (C) Vista en detalle del cuadro indicado en la imagen B. El panel izquierdo muestra la superposición de la localización de *S. meliloti* (verde) y los núcleos celulares (azul), el panel central muestra la localización de MtYSL8-HA marcado con Alexa 594 (rojo). El panel de la derecha muestra la superposición del panel izquierdo y central. Las flechas indican la Banda de Caspary. Barras de escala (A): 200µm; (B): 100µm; (C): 50µm

La inmunolocalización en raíz corroboró lo que ya se vio con GUS, y es que MtYSL8 se localizaba en las células que se encuentran rodeando el xilema en endodermis y vasos (Figura 45).

Figura 45. Localización de MtYSL1 en raíz. Imagen de microscopía confocal con la localización de MtYSL8-HA en una sección transversal de raíces de 28dpi de *M. truncatula*. La posición de MtYSL8 se determinó usando un anticuerpo conjugado con Alexa 594 (rojo, panel derecho). El panel izquierdo es la superposición del panel derecho junto con la imagen de transiluminación de la raíz.

Todos estos datos, parecen indicar que, MtYSL8 podría ser un buen candidato en el transporte de metales hacia el nódulo, ya que éste se localiza en torno a los vasos del mismo.

2.3.3. MtYSL8 es funcionalmente equivalente a AtYSL1 y AtYSL3

Para estudiar la capacidad de transporte de metales de MtYSL8, se evaluó si era capaz de complementar el fenotipo del mutante de *Arabidopsis ysl1ysl3* (Waters et al., 2006). Para llevar a cabo este experimento se transformaron plantas *Atysl1ysl3* con la secuencia codificante de *MtYSL8*, bajo un promotor 35S. Una vez cosechadas las semillas transformantes, se plaquearon

en medio MS junto con plantas control (Col-0) y plantas mutantes *Atysl1ysl3*. Las plantas mutantes transformadas con MtYSL8 revirtieron parcialmente el fenotipo de clorosis intervenal del mutantes *Atysl1ysl3*, asemejándose más a las plantas control (Figura 46A). Esto se confirmó mediante la medida de clorofilas de las hojas. Los valores de clorofila total de las plantas mutantes transformadas con MtYSL8 son próximos a los valores de las plantas Col-0, mientras que el mutante, debido a la clorosis intervenal, presenta valores más bajos (Figura 46B).

A

B

Figura 46. Ensayo de transporte de hierro en *Atysl1ysl3*. Las plantas *Atysl1ysl3* se transformaron con la secuencia codificante de MtYSL8 en el vector pGWB2 (bajo un promotor 35S). Las semillas de Col-0 (WT), del mutante *Atysl1ysl3* y de *Atysl1ysl3::MtYSL1* se plaquearon en medio MS. Las placas se incubaron durante 15 días.

2.3.4. La mutación de MtYSL8 provoca una disminución de actividad nitrogenasa.

Al igual que en casos anteriores, para conocer el papel de los transportadores en la fijación simbiótica de nitrógeno, se recurrió al uso de mutantes insercionales *Tnt1*, procedentes de la colección de la Samuel Roberts Noble Foundation. Se obtuvieron dos líneas mutantes: NF17945 (*ysl8-1*), que tenía la inserción del transposón en la posición +342 del primer exón; y la segunda, NF12068 (*ysl8-2*) que tenía el *Tnt1* en la posición -18, justo delante del codón de inicio (Figura 47A). Una vez realizado el genotipado de las líneas segregantes y obtenidas las líneas

homocigotas *ysl8-1* y *ysl8-2*, se realizó una PCR semicuantitativa a partir de RNA de nódulo para ver si existía transcrito de *MtYSL8* en estas líneas mutantes. En ambas líneas se detectó el transcrito de *MtYSL8*, pero con menor intensidad que en los nódulos control, por lo que parecen líneas *Knock down* (Figura 47B). Sin embargo, en la línea *ysl8-1*, la banda que aparecía era muy tenue, y ligeramente de mayor tamaño que la que aparecía en el control y en la línea *ysl8-2* (Figura 34B).

Figura 47. Líneas mutantes por la inserción de *Tnt1* en *MtYSL8*. (A) Posición del lugar de inserción de *Tnt1* en el gen *MtYSL8* para dar lugar a los mutantes *ysl8-1* (NF17945) y *ysl8-2* (NF12068). (B) Expresión por RT-PCR de *MtYSL8* en nódulos de *M. truncatula* de 28dpi control (WT), y nódulos *ysl8-1* y *ysl8-2*. Control positivo, expresión de la *Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*.

Tras secuenciar dicho fragmento que aparecía en la línea *ysl8-1* se vio que, el transcrito que se detecta contiene un vestigio de 30 pb del transposón *Tnt1*. Esta inserción 3, no alteraba la pauta de lectura en la traducción del ARN mensajero, pero introducía 9 aminoácidos diferentes, de los cuáles 4 de ellos eran aminoácidos adicionales. Estas modificaciones sobre la secuencia aminoacídica de *MtYSL8* provocarían cambios en la estructura de la proteína. Usando un programa de predicción de dominios transmembrana, se detectó que el posible cambio que producían estos 9 aminoácidos en la proteína final, consistía en la sustitución de dos dominios transmembrana (Figura 48A), por un enorme bucle extracelular (Figura 48B). Dado que la

estructura proteica y los aminoácidos implicados en el transporte de los YSLs, no están descritos ni caracterizados, se desconoce si esta modificación en la estructura de la proteína MtYSL8 en el mutante *ysl8-1* podría estar manteniendo su función de transporte. En cualquier caso, la cantidad de estos transcritos “modificados” de MtYSL8 en *ysl8-1*, se encuentran en muy baja cantidad, y la proteína con dos dominios transmembrana menos, podría ser no funcional.

A

B

Figura 48. Topología de MtYSL8 y del transcrito modificado detectado en el mutante *ysl8-1*. (A) Estructura de la proteína MtYSL8 nativa. (B) Estructura de la proteína del transcrito modificado con 30 pb del *Tnt1* que se detectó en el mutante *ysl8-1*. Para ambas predicciones se usó el programa Protter.

Para determinar si la mutación y/o el silenciamiento de MtYSL8 tiene algún efecto en la fijación simbiótica de nitrógeno, se llevaron a cabo experimentos para evaluar el fenotipo de plantas silvestre (WT) y mutantes *ysl8-1* y *ysl8-2* en simbiosis con *S. meliloti* 2011. Tras 28 dpi se

observó que, ambas líneas presentaban defectos en el crecimiento (Figura 49A). Este menor crecimiento se refleja en un descenso del peso seco de la parte aérea y de la raíz, por parte de las plantas *ysl8-1* y *ysl8-2*, respecto a las plantas WT (Figura 49E). Aunque no se apreciaban diferencias visibles en tipo de nódulos entre WT y mutantes (Figura 49B), el número de nódulos por planta también se veía reducido en torno al 50 % en ambas líneas mutantes (Figura 49D). Todo ello, se traducía en un descenso de la actividad nitrogenasa de un 70 % en el caso de *ysl8-1* y de un 52 % en el caso la línea *knock down ysl8-2* (Figura 49C).

Figura 49. Fenotipo de plantas WT y mutantes *ysl8-1* y *ysl8-2* en condiciones simbióticas. (A) Crecimiento de una de las plantas representativas de WT, *ysl8-1* y *ysl8-2*. Barra de escala = 3cm. (B) Nódulos representativos de cada línea. Barra de escala = 1cm. (C) Actividad nitrogenasa en nódulo de 28dpi. La reducción de acetileno fue medida por duplicado en 2 sets de un grupo de 4-6 plantas cada uno. Los datos representan la media $\pm$ ES. (D) Número de nódulos por planta. Los datos representan la media $\pm$ ES (n=8-10 plantas). (E) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos representan la media $\pm$ ES (n=8-10 plantas).

Todos estos datos parecen indicar que MtYSL8 tiene una función en la simbiosis, ya que las plantas con el gen mutado o silenciado presentan fenotipo defectuoso. Sin embargo, de igual modo que con otros transportadores que también tienen expresión en raíz, se llevó a cabo la caracterización del fenotipo en condiciones no simbióticas, para ver si los defectos en el fenotipo observado en los mutantes en simbiosis, se debe a la función que realiza MtYSL8 en la raíz, o en el nódulo principalmente. Para ello, se regaron las plantas WT, *ysl8-1* y *ysl8-2* con una solución de riego suplementada con nitrato amónico, y no fueron inoculadas. Los resultados indicaban que no había diferencias significativas de crecimiento entre las plantas mutantes y las plantas control (Figura 50A), lo que se veía reflejado en las medidas de peso seco, donde no se apreciaban diferencias significativas entre plantas *ysl8-1* y *ysl8-2* y las plantas de tipo silvestre (Figura 50B). Igualmente, no se apreciaban diferencias en el contenido de clorofilas (Figura 50C).

A

B

Figura 50. Fenotipo de plantas WT y mutantes *ysl8-1* y *ysl8-2* en condiciones no simbióticas. (A) Crecimiento de plantas representativas control (W) y mutantes *ysl8-1* y *ysl8-2*. Barra de escala = 3cm. (B) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos representan la media de $\pm$ ES (n=10 plantas). (C) Contenido de clorofila. Los datos representan la media de $\pm$ ES (n=4 plantas).

Con el fin de saber si el fenotipo observado en *ysl8-1* en simbiosis se debe o no la alteración en la homeostasis de metales, se llevó a cabo la medición del contenido de metales por ICP-MS en plantas control y plantas mutantes *ysl8-1* (Figura 51). El contenido de hierro en partes aéreas se veía incrementado en el mutante, pero no se apreciaban cambios significativos en el contenido este metal en raíces o partes aéreas (Figura 51A). Por otro lado, los nódulos *ysl8-1* tenían un 35 % más de cobre que lo nódulo control, no encontrándose diferencias en el contenido de este metal en raíces y partes aéreas (Figura 51B). Por último, el zinc se encontraba en mayor cantidad en todas las partes de la planta en el mutante, llegando incluso a tener un 57 % más zinc los nódulos mutantes que los nódulos control (Figura 51C).

Figura 51. Contenido de metales en plantas control y mutantes *ysl8-1*. (A) Contenido de hierro (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. (B) Contenido de cobre (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno. (C) Contenido de zinc (ppm) en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas con 28dpi. Las barras indican la media $\pm$ ES de 2 sets de un grupo de 5 plantas cada uno.

DISCUSIÓN

Las leguminosas son un cultivo clave en la agricultura mundial por varios motivos (Graham & Vance, 2003). Se trata de la principal fuente de proteínas en muchas zonas del mundo, y debido a su capacidad de llevar a cabo la FSN, se trata de una alternativa sostenible al uso de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura (Smil, 1999). Como en cualquier planta, la absorción de los metales desde el suelo y su distribución sistémica es crítica. Pero, además, en las leguminosas, esta demanda de metales se ve incrementada al contar con un órgano sumidero extra, el nódulo, que precisa de un gran aporte de metales para la síntesis de metaloproteínas necesarias para la FSN, como la nitrogenasa (Miller et al., 1993) o la leghemoglobina (Appleby, 1984).

Al igual que en otras plantas dicotiledóneas, en las leguminosas, la absorción de hierro desde el suelo, y presumiblemente la de otros metales, se lleva a cabo mediante lo que se conoce como Estrategia I (Kobayashi & Nishizawa, 2012). Por ejemplo, la solubilidad del Fe^{3+} se incrementa por la acidificación del suelo, debido a la extrusión de protones por parte de la planta, posteriormente este Fe^{3+} se reduce por una ferreductasa a Fe^{2+} , que se importa a la planta a través de transportadores específicos en la epidermis de la raíz (Andaluz et al., 2009). Una vez dentro de la planta, el hierro y otros metales se distribuyen a los distintos órganos sumidero, en el caso de las leguminosas, a la parte aérea y al nódulo. Datos de sincrotrón por fluorescencia de rayos X indican que, al menos en nódulos indeterminados, el hierro llega por el cilindro vascular y éste es liberado al apoplasto en la zona de infección del nódulo (Rodríguez-Haas et al., 2013). En esta zona, y probablemente en la interzona con la zona III de fijación de nitrógeno, el hierro es transportado desde el apoplasto hacia el interior de las células, antes de ser entregado a los bacteroides. Los resultados descritos en este trabajo indican que MtNramp1 participa en la translocación de hierro a través de la membrana plasmática.

Transporte de hierro desde el apoplasto hacia el interior de las células infectadas del nódulo

Al contrario de lo que ocurre en soja (Kaiser et al., 2003), *M. truncatula* no tiene ningún transportador Nramp específico de nódulo. Sin embargo, de entre los 7 miembros de la familia Nramp identificados en *M. truncatula*, MtNramp1 mostró el nivel de expresión más alto en nódulos. Los ensayos de complementación en levaduras revelaron que MtNramp1 puede transportar hierro y manganeso hacia el interior de las células, consistente con un posible papel en la captación de hierro por parte de las células infectadas por rizobios. Sin embargo, para que

esto fuera posible, MtNramp1 debería localizarse en la membrana plasmática de las células localizadas en la zona de infección del nódulo.

Dado que el hierro se libera en el apoplasto de las células de la zona II, y dado que poco o nada de hierro se ha encontrado en zona III (Rodríguez-Haas et al., 2013), la conclusión sería que transportadores Nramp o ZIP deberían mediar el transporte de este hierro desde el apoplasto hacia el citosol de las células de esta región del nódulo. Los datos de fusión del promotor::*gus* y la información de la expresión génica proporcionada por la base de datos Symbimics para *MtNramp1*, indicaban que este gen se expresaba en la zona II del nódulo. Además, los estudios de inmunolocalización del transportador y su localización con marcadores de membrana plasmática indicaron que se encuentra en la membrana plasmática, a diferencia de GmDMT1, que se localizó en la membrana del simbiosoma (Kaiser et al., 2003). Esta localización en *M. truncatula* no parece ser un artefacto consecuencia de ninguna de las fusiones creadas, porque: i) la adición del epítipo HA no tuvo ningún efecto importante sobre la estructura y, por tanto, función de la proteína, como se demostraba en la conservación de su capacidad de transporte en levaduras y en *M. truncatula*; y ii) los datos de transcriptómica sobre la expresión de *MtNramp1* en diferentes partes del nódulo (Roux et al., 2014) mostraron una máxima expresión en la zona II y la interzona II-III, precisamente donde el hierro es más prevalente en el apoplasto. Estos datos podrían explicar por qué la media de los niveles de transcripción de *MtNramp1* en los nódulos enteros era más baja que en las raíces, ya que *MtNramp1* parecía limitarse sólo a unas pocas capas de células, su ARN mensajero podría estar diluyéndose entre el de las otras muchas células del nódulo que no expresan este gen.

Otra evidencia de que MtNramp1 tendría un papel en el suministro de hierro para la FSN, se confirma con el análisis de las plantas mutantes *nramp1-1*. Estas plantas acumulaban más hierro en las raíces que las plantas de tipo silvestre, bajo condiciones de deficiencia de hierro. Esto era consistente con la localización de MtNramp1 en la endodermis de la raíz (la capa de células en las que se visualizó la banda de Caspary). La mutación de un transportador implicado en la translocación de hierro en las células de la endodermis, resultaría en una acumulación de hierro en el apoplasto de la raíz, y como resultado, el contenido de hierro en la raíz se vería incrementado. Esto fue exactamente lo que se observó en las raíces *nramp1-1*, donde se detectaron algunos depósitos de hierro en el apoplasto. Sin embargo, el papel de MtNramp1 en condiciones no simbióticas parecía ser muy limitado, incluso bajo condiciones de deficiencia de

hierro, ya que no se observó un fenotipo adicional y la respuesta de deficiencia de hierro no se indujo más en el mutante. Alternativamente, otros transportadores de la endodermis podrían enmascarar un fenotipo de *nramp1-1* en condiciones no simbióticas. Independientemente del mecanismo, el hecho de que el mutante *nramp1-1* no tuviera diferencias significativas en el contenido de clorofila, en comparación con las plantas control, ni tuviera activada la respuesta de deficiencia de hierro, indicaría que el hierro que llega a los órganos sumidero es suficiente, independientemente de la actividad de MtNramp1. Estos resultados sugieren que: i) MtNramp1 podría estar involucrado en la absorción de hierro entregado a la endodermis a través de la vía apoplástica, y ii) que el hierro que llega a la endodermis a través de la vía simplástica sería suficiente para satisfacer los requerimientos de hierro en condiciones no simbióticas.

En contraste con las plantas en condiciones no simbióticas, las plantas *nramp1-1* en condiciones simbióticas, sin un aporte externo de nitrógeno, presentaban grandes defectos de crecimiento, que se traducían en una reducción dramática de la biomasa. Esto se acompañaba de una reducción de la nodulación y una consiguiente reducción de la actividad nitrogenasa en estas plantas. Todos estos fenotipos fueron suprimidos por la adición de altos niveles de hierro (Sequestrene® Fe-EDDHA) a la solución nutritiva o por la expresión del gen nativo MtNramp1 en las plantas mutantes, lo que indicaba la importancia de MtNramp1 en el suministro de hierro para llevar a cabo la FSN. Sin embargo, se podría argumentar que este efecto podría deberse a que el hierro no se introducía en la vasculatura y, por consiguiente, no se transportaba al nódulo, dado el reducido contenido de hierro en los nódulos *nramp1-1* (Figura 18F). Para probar esta hipótesis, MtNramp1 se fusionó a un promotor de un gen MATE específico de nódulo, y con un patrón de expresión similar a MtNramp1 en los nódulos. Esta construcción fue capaz de mejorar el crecimiento de *nramp1-1* así como de aumentar el número de nódulos funcionales, como indicaba el mayor número de nódulos rojos y el aumento de actividad nitrogenasa. Por lo tanto, aunque parte del fenotipo de *nramp1-1* se debiera a que el hierro quedaba retenido en la raíz, una parte sustancial era probablemente debido a la incapacidad de las células del nódulo para tomar hierro del apoplasto.

Si bien la entrada de hierro a la célula parecería ocurrir como Fe^{2+} al ser mediada por MtNramp1 (los Nramp sólo transportan cationes divalentes)(Nevo & Nelson, 2006), la observación de que el hierro llegaría asociado con citrato (Takanashi et al., 2013), y por tanto como Fe^{3+} (Rellán-Álvarez et al., 2010), sugeriría la existencia de una o varias ferredoxinas de la familia FRO en las células de los nódulos, que redujeran el hierro. Un fenómeno parecido

ocurre en hojas de *A. thaliana*, donde AtFRO6 es responsable de reducir el Fe^{3+} que llega a las hojas para ser usado en la fotosíntesis (Mukherjee et al., 2006, Feng et al., 2006). Evidencia adicional de que esta actividad ferredoxina es necesaria en los nódulos, han sido proporcionado por estudios bioquímicos que muestran que existe un aumento de actividad ferredoxina en nódulos de judía (Slatni et al., 2011).

Mientras que MtNramp1 parecía jugar un papel importante en la homeostasis de hierro, éste no parecía tener ninguna función importante en la nutrición de manganeso, a pesar de su capacidad de transportar Mn^{2+} que se mostraba en levaduras (posiblemente una habilidad adquirida por la sobreexpresión del transportador en un sistema heterólogo). La reducción en el contenido de manganeso que se observaba en raíces *nramp1-1* en algunas condiciones, indicaría que MtNramp1 no estaría involucrado en el transporte de manganeso en planta. Los cambios en los niveles de manganeso por la mutación de *MtNramp1* podrían ser el resultado de la adaptación de la planta a un transporte alterado de hierro a larga distancia, como consecuencia de los cambios en la distribución de hierro causados por la mutación MtNramp1.

En conclusión, MtNramp1 participaría la captación de hierro desde el apoplasto por parte de las células que contienen rizobios en la zona II del nódulo, y parece tener una importancia menor en la raíz en el transporte de hierro hacia la parte aérea. En contraste con lo que ocurre en GmDMT1, otro transportador Nramp de soja, que se encuentra localizado en el simbiosoma (Kaiser et al., 2003). Otros transportadores podrían ayudar a MtNramp1 en el transporte de hierro en los nódulos, ya que el mutante *nramp1-1* producía algunos nódulos parcialmente funcionales. MtNramp7 podría desempeñar este papel, porque es el único miembro de la familia Nramp en *M. truncatula* con un patrón de expresión similar a MtNramp1. Sin embargo, MtNramp7 mostró bajos niveles de expresión en el nódulo, y de acuerdo a la base de datos Symbimics, se expresa principalmente en la zona III en lugar de expresarse en zona II. Por ello, no se puede descartar que un transportador ZIP o incluso un YSL pudiera contribuir a la captación de hierro en las células fijadoras de nitrógeno.

Transporte de metales desde el cilindro vascular hacia el apoplasto del nódulo.

Los transportadores YSL a menudo se han encontrado asociados al transporte de metales a larga distancia en plantas, es decir, proporcionando estos metales en forma de complejos metálicos a órganos sumidero (Lubkowitz, 2011). Dado que el nódulo es un sumidero más, no es

de extrañar que existan transportadores YSL expresados en este órgano. Experimentos previos de transcriptómica, mostraron dos YSLs que se inducía en nódulo frente a la raíz fertilizada con nitrógeno, estos eran MtYSL1 y MtYSL8. Sin embargo, no se trataban de genes específicos de este órgano, dado que también presentaba expresión en raíces, ni tampoco era los YSLs que más se expresaban en nódulo. Tras comprobar la expresión de los 9 YSLs que se encuentran en el genoma de *M. truncatula*, ninguno de ellos resultó ser específico de nódulo. Hasta la fecha no se ha descrito ningún transportador YSL con estas características, ni en nódulos determinados ni indeterminados.

La función que se les ha descrito a YSLs en otras especies dicotiledóneas, está asociada con la de descarga de metales desde los vasos (DiDonato et al., 2004, Waters et al., 2006, Koike et al., 2004), por lo tanto, MtYSL1 podría ser un buen candidato para sacar metales desde el cilindro vascular hacia el apoplasto del nódulo. La fusión del promotor de MtYSL1 con el gen *gus* se detectó en las células de la periferia del nódulo y en torno a los vasos, lo que coincidiría en parte, con la hipótesis propuesta. La inmunolocalización confirmó la localización en torno a los vasos, concretamente, MtYSL1 se localizaba en la membrana plasmática de las células de la endodermis del vaso del nódulo, y en las capas de células que los rodeaban, así como en las células del parénquima del nódulo. En la raíz, los experimentos de GUS localizaron a MtYSL1 en una capa de células alrededor del cilindro vascular. Esta capa de células con ayuda de la inmunolocalización fue identificada como el periciclo, al marcar la banda de Caspary con berberina, MtYSL1 se localizaba en la periferia de las células adyacentes a la endodermis, es decir, en el periciclo. MtYSL1 sería un transportador de membrana plasmática como indicaban los experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco junto con un marcador de membrana. En la raíz, MtYSL1 podría estar teniendo una función similar a la que tenía MtNramp1 en la endodermis, pero un paso más adelante en el proceso de carga de estos metales en el xilema para que puedan viajar a través de la planta hacia los sumideros donde sean necesarios.

Trabajos previos en *L. japonicus* han descrito que el hierro podría entrar al nódulo como hierro-citrato al existir un transportador LjMATE1 específico de nódulo que, al mutarlo, resulta en una acumulación de hierro en el cilindro vascular (Takanashi et al., 2013). Se han encontrado complejos cobre-NA en el xilema de tomate (Rellán-Álvarez et al., 2010), por lo que es posible que el cobre llegue al nódulo formando este complejo y MtYSL1 podría ser el encargado de

introducirlo en el nódulo. Además, tanto los experimentos de GUS, como la inmunolocalización, ubicaban a este transportador en las células del parénquima del nódulo. En estas células es donde tiene lugar la bajada en la concentración de oxígeno para crear el ambiente de anaerobiosis en el interior del nódulo (Witty et al., 1986), por lo que es posible que tengan una elevada respiración celular para consumir ese oxígeno (Becana & Rodríguez-Barrueco, 1989). Esta elevada respiración celular necesitaría de un gran aporte de cobre y hierro para las enzimas de la cadena de transporte electrónico. Por lo que MtYSL1 podría estar teniendo la función de proporcionar estos metales en estas células con alta respiración celular en el parénquima del nódulo. Sin embargo, experimentos de complementación en levaduras mutantes en el transporte de cobre, hierro o zinc no fueron capaces de restaurar su crecimiento cuando fueron transformadas con la secuencia codificante de MtYSL1 cuando los metales fueron proporcionados libres o en complejos con NA.

MtYSL1 se localiza en el grupo III del árbol filogenético. En este grupo, hasta la fecha, se han descrito pocos miembros, tan solo AtYSL7 y AtYSL8 de *A. thaliana*, de los que se ha descrito su capacidad de transportar péptidos (Hofstetter et al., 2013). Por ello, se planteó la hipótesis de que MtYSL1 podría ser un transportador de péptidos pequeños. Primero se decidió examinar el transporte de GSH por varias razones. La primera porque los YSLs pertenecen a la familia de los OPTs (Yen et al., 2001, Lubkowitz, 2011). Algunos OPTs descritos, como AtOPT4 y AtOPT6 (Zhang et al., 2016, Cagnac et al., 2004), tienen la capacidad de transportar este tripéptido. La segunda razón fue porque GSH realiza importantes funciones en la FSN (Becana et al., 2010). Dada la inducción de expresión de MtYSL1 en el nódulo, éste podría estar desempeñando la función de transportar este tripéptido en nódulo. De este modo, estaría interviniendo en la defensa antioxidante de las ROS que se producen en el nódulo debido a las altas tasas de respiración celular para propiciar el ambiente anaerobio necesario para que la nitrogenasa lleve a cabo su función (Becana & Rodríguez-Barrueco, 1989). Sin embargo, MtYSL1 no fue capaz de restaurar el fenotipo de levaduras mutantes en el transportador de glutatión HGT1, no pudiéndose demostrar que MtYSL1 estuviera transportando este tripéptido. Por el contrario, sí se pudo probar la capacidad de MtYSL1 de transportar péptidos de entre 4 y 6 aminoácidos en levaduras, que, aunque a priori, los péptidos usados en el experimento, no tienen una función biológica descrita en planta, fueron útiles para demostrar la capacidad de MtYSL1 de transportar péptidos pequeños.

Para tener más detalle acerca de la función de MtYSL1 en los nódulos y su vinculación al transporte de metales, se obtuvieron las líneas mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2*. Al contrario de lo que pasa en *A. thaliana*, los mutantes simples fueron suficientes como para ver una alteración en el fenotipo en plantas en simbiosis, mientras que en el otro organismo modelo es frecuente que se requieran de dobles mutantes (Waters et al., 2006, Conte et al., 2013). Esto podría deberse a que el desarrollo de los nódulos fuera posterior al momento evolutivo que originó la redundancia funcional de los YSLs, y que sólo uno de la dupla funcional de genes se neofuncionalizara para jugar un papel en la FSN. En ambas líneas mutantes se observaron defectos en el desarrollo, con plantas de porte más pequeño, lo que se traducía en plantas con un menor peso seco. Aunque ambas líneas mutantes presentaban nódulos rojos y aparentemente completamente activos como los de las plantas control, tanto *ysl1-1*, como *ysl1-2*, mostraban una menor actividad nitrogenasa. Esto indicaba que MtYSL1 podría tener una importante función en el nódulo para la FSN. Sin embargo, el fenotipo observado en plantas bajo condiciones simbióticas podría deberse, no sólo a la función que estaría desempeñando MtYSL1 en nódulo, sino también a su función en la raíz. Esta idea fue confirmada cuando se examinó el fenotipo de *ysl1-1* y *ysl1-2* en condiciones no simbióticas. En ambos casos, las plantas presentaban un menor crecimiento que las plantas control, lo que se traducía en un peso seco medio menor en el caso de las plantas mutantes. Al encontrarse mutado *MtYSL1* en la raíz de estas plantas, podría estar viéndose afectado el transporte a larga distancia. Por tanto, el fenotipo de las plantas mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2* observado en condiciones de simbiosis puede deberse en parte al encontrarse mutado *MtYSL1* en raíz, dado que el fenotipo también se observa en condiciones de no simbiosis. Por ello, sería necesaria realizar una complementación genética específica de nódulo como se hizo en *MtNramp1*, y ver si MtYSL1 bajo un promotor específico de nódulo sería capaz de complementar el fenotipo de las plantas mutantes.

Aunque los experimentos de transporte de metales en levaduras no resultaron esclarecedores, la medición del contenido de metales en la línea mutante *Knock out ysl1-2*, podría aportar información acerca de si MtYSL1 estaría teniendo una función en la homeostasis de metales en la planta. Aunque en levaduras, MtYSL1 no fue capaz de transportar hierro, cobre ni zinc libres o asociados a NA, en los nódulos de las plantas mutantes *ysl1-2* parecían acumularse los tres metales en mayor cantidad que en los nódulos control. Además, en el caso del hierro, no sólo se acumula más hierro en los nódulos, sino también en las partes aéreas y en las raíces mutantes. Por lo tanto, parecía que la homeostasis de hierro se veía alterada en las

plantas mutantes *ysl1-2*. Sin embargo, MtYSL1 no fue capaz de restaurar el fenotipo de clorosis intervenal que presentaba el mutante de *Arabidopsis ysl1ysl3* que también tiene alterada la homeostasis de hierro. Tampoco la adición de hierro en exceso (Sequestrene® Fe-EDDHA) en la solución nutritiva, restauraba el efecto de la mutación de MtYSL1 en las plantas *ysl1-2*, estas seguían presentando una menor actividad nitrogenasa y un menor peso seco que las plantas control, como ocurría en condiciones estándar de hierro. El crecimiento plantas mutantes bajo deficiencia de hierro, tampoco cambió el fenotipo de *ysl1-2* en condiciones simbióticas. Por lo tanto, a pesar de que el hierro se acumulaba en todas las partes de la planta mutante, no fue posible asociar este fenotipo al transporte de hierro por parte de MtYSL1. Los ensayos de complementación por cobre y zinc tampoco fueron capaces de restaurar el fenotipo de *ysl1-2*, sin bien parecía que el exceso de metal era parcialmente más tóxico para la planta mutante.

Si bien MtYSL1 no parecería ser funcionalmente equivalente a AtYSL1 o AtYSL3, MtYSL8, con un mayor parecido a nivel de secuencia podría serlo. Éste es un transportador que se expresa en toda la planta, en partes aéreas y en raíces, pero su máximo de expresión lo tiene en nódulo. Filogenéticamente pertenece al grupo I, en el que más miembros se encuentran descritos. A este grupo, a diferencia de lo que ocurría con MtYSL1, pertenecen todos los YSLs que ya se han descrito como transportadores de metales. Entre ellos se encuentran ZmYS1, capaz de transportar Fe^{2+} -NA y Fe^{3+} -DMA (Curie et al., 2001), OsYSL15 también capaz de transportar los mismos complejos (Inoue et al., 2009), AtYSL2, capaz de transportar Fe^{2+} -NA y Cu^{2+} -NA (DiDonato et al., 2004) o AtYSL3 capaz de transportar también Fe^{2+} -NA (Chu et al., 2010). Estos dos últimos se encuentran además filogenéticamente muy cercanos a MtYSL8.

Los experimentos de localización tisular por GUS mostraron una clara localización de la expresión de *MtYSL8* exclusivamente en los vasos y no en otras zonas del nódulo. En las raíces también se encontraba en el interior del cilindro vascular, en las células que rodean al xilema. La localización subcelular por inmunohistoquímica confirmaba que MtYSL8 se encontraba en torno a los vasos del nódulo, pero en este caso también se vio localización de la proteína en las células adyacentes a los vasos, coincidiendo estas con las células del parénquima del nódulo como ocurría con MtYSL1. A diferencia de MtYSL1, MtYSL8 en la raíz no tiene localización en el periciclo, sino en las células del parénquima xilemático. Por tanto, MtYSL1 y MtYSL8 tienen una localización muy similar en el nódulo de *M. truncatula*, lo que se podría interpretar como redundancia génica, pero teniendo en cuenta la amplia variedad de sustratos que son capaces

de transportar los YSLs (Conte & Walker, 2012), es posible que, aunque tengan la misma localización, el sustrato que transportan sea diferente.

Otra semejanza con MtYSL1, es que ambas líneas mutantes en MtYSL8, *ysl8-1* y *ysl8-2* presentaban una disminución en la actividad nitrogenasa de entre 60 y 50 % respectivamente, a pesar de no haber diferencias en el tipo y número de nódulos entre las plantas mutantes y las plantas control. Esta disminución de la actividad nitrogenasa se traducía en un menor crecimiento y una menor biomasa en las plantas *ysl8-1* y *ysl8-2*. Sin embargo, en el caso de estos mutantes, no había diferencias en el fenotipo respecto a las plantas de tipo silvestre, en condiciones no simbióticas, cosa que sí ocurría en los mutantes *ysl1-1* y *ysl1-2*. Por tanto, en el caso de MtYSL8, el fenotipo observado en condiciones simbióticas sí parecía asociarse a la función de MtYSL8 en el nódulo, y no a su función en la raíz, puesto que la mutación en MtYSL8 no afectaba al crecimiento de las plantas fertilizadas con nitrógeno.

La medida del contenido de metales en plantas control y plantas mutante *ysl8-1* bajo condiciones simbióticas, mostraron que sólo cobre y zinc encuentran alterada su homeostasis en el nódulo. Ambos metales se encontraban en mayor cantidad en los nódulos mutantes *ysl8-1* que en los nódulos de tipo silvestre. En el caso del cobre, éste no se encuentra alterado en el mutante en otras partes de la planta, tan solo en el nódulo. Por el contrario, el zinc se encontraba en mayor cantidad en todas las partes de la planta mutante analizadas: parte aérea, raíz y nódulo. No se observaron cambios en cuanto a la cantidad de hierro en las plantas *ysl8-1* respecto a las plantas control, lo que a priori no parece que MtYSL8 esté interviniendo en el transporte de hierro, puesto que la homeostasis de este metal no se encontraba alterada cuando se mutaba este transportador. Sin embargo, en los experimentos en los que se intentó complementar el fenotipo del doble mutante de *Arabidopsis ysl1ysl3*, MtYSL8 sí fue capaz de restaurar la clorosis intervenal que caracteriza a este mutante, ya que los valores en el contenido de clorofila de las plantas *ysl1ysl3* transformadas con MtYSL8 próximos al valor de Col-0. De este experimento se concluyó que MtYSL8 era capaz de transportar Fe^{2+} -NA, ya que revertía el fenotipo de clorosis de este doble mutante *ysl1ysl3*, y tanto AtYSL1, como AtYSL3 son capaces de transportar este complejo (Waters et al., 2006, Chu et al., 2010). *Atysl1ysl3* se caracteriza por tener alterada la homeostasis de hierro, puesto que cuando se aplica hierro externo en forma de Fe-EDDHA, también se revierte fenotipo, de forma similar a como lo hace cuando estas plantas se transforman con MtYSL8. El hecho por el que no se vio cambios en la homeostasis de hierro

en el mutante *ysl8-1*, a pesar de ser capaz de transportar este metal como se vio con la complementación de *Atysl1ysl3*, no implica que, en planta, MtYSL8 no esté transportando hierro. Este mismo efecto se observa en las plantas *Atysl1ysl3* cuando son crecidas en un sustrato de turba comercial, en el que a pesar de presentar clorosis intervenal visible, las plantas no tienen cambios en el contenido de hierro en la parte aérea respecto de las plantas control (Waters et al., 2006). Sin embargo, estos dobles mutantes presentan mayor cantidad de cobre, zinc y manganeso en la parte aérea, algo parecido a lo que ocurre en *ysl8-1*. Por tanto, el hecho de que no se vieran cambios en las cantidades de hierro en el mutante *ysl8-1*, no sería motivo por el que descartar que MtYSL8 esté transportando este metal en planta.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, en la Figura 51 se representa un modelo tentativo de transporte de metales a los nódulos indeterminados. En este modelo, los metales se incorporarían desde el suelo utilizando la Estrategia I y llegarían al haz vascular de la raíz por las vías simplástica y apoplástica. Para llegar a los vasos, en este caso el hierro apoplástico sería absorbido por las células de la endodermis, muy probablemente con la ayuda de MtNramp1. A continuación MtYSL1 introduciría estos metales en el cilindro vascular de la raíz y posteriormente MtYSL8 lo haría hacia el xilema. Los metales viajarían por el xilema formando complejos con diferentes moléculas orgánicas, el hierro con citrato, el cobre probablemente con NA y el zinc se desconoce, posiblemente con histidina o citrato también. Una vez estos metales llegan a la zona II del nódulo tienen que ser liberados al apoplasto, en esta función podrían estar interviniendo MtYSL1 y MtYSL8, sacando los metales del cilindro vascular para introducirlos al nódulo. Los metales se acumularían en el apoplasto, donde son introducidos al citosol de las células. MtYSL1 y MtYSL8 podrían estar introduciendo metal en las células del parénquima del nódulo, mientras que MtNramp1 estaría introduciendo hierro en las células infectadas. Otros metales como el zinc, el cobre o el molibdeno serían introducidos en las células con rizobios mediante transportadores ya descritos como MtZIP6, MtCOPT1 y MtMOT1.3 respectivamente.

Una vez en el interior de la célula, los metales deben llegar al bacteroide para la síntesis de metaloproteínas implicadas en la FSN. Un homólogo putativo de LjSEN1 podría ser el responsable de la translocación de hierro a través de la membrana del simbiosoma (Hakoyama et al., 2012). En este proceso, un transportador de citrato adicional podría jugar un papel, dado que el hierro-citrato es la fuente preferida de hierro quelado para algunos rizobios (LeVier et al., 1996). Los estudios futuros se dirigirán hacia la prueba de este modelo, así como hacia la

determinación de la identidad de otros transportadores implicados en el transporte de metales hacia el bacterioide.

Figura 52. Modelo propuesto para el transporte de metales desde el cilindro vascular del nódulo hasta las células infectadas

CONCLUSIONES

1.-MtNramp1 is the transporter responsible for iron uptake by rhizobia-infected *M. truncatula* nodule cells. This transporter is located in the plasma membrane of the cells, and mediates Fe^{2+} uptake from the apoplast. In line with this role, *MtNramp1* mutation diminishes iron delivery to nitrogenase, causing a reduction of plant growth under symbiotic conditions.

2.- MtNramp1 would play a minor role in iron uptake through the apoplastic pathway to the endodermis. Although it is expressed in this tissue, loss of *MtNramp1* does not cause any significant change in plant growth. This may indicate that either the apoplasmic pathway in roots for iron delivery is minority, or that there is another functionally redundant transporter.

3.- The Fe^{2+} substrate requirement of Nramp transporters, and the role of citrate in iron delivery to nodules as an Fe^{3+} -complex, suggests the existence of a ferredoxin activity encoded by a yet-to-be-identified gene that would determine iron uptake by rhizobia-infected nodule cells.

4.- MtYSL1 is a YSL family member required for nitrogen fixation in *M. truncatula* nodules. Although its substrate identity has not been determined, based on the metal level changes in mutant plants and in the heterologous complementation assays, this could be a metal-binding peptide and not nicotianamine, glutathione, or phytochelatin. MtYSL1 localization suggests a role in metal delivery from the vasculature to the nodules.

5.- MtYSL1 would also play a relevant role in metal delivery through the vasculature under conditions where available nitrogen is present in soil, as indicated by the lower biomass production of *ys1-1* and *ys1-2* mutants.

6.- MtYSL8 is a YSL transporter functionally analogue to *A. thaliana* YSL1 and YSL3 transporters, as indicated by MtYSL8 capacity to restore the interveinal chlorosis phenotype of *A. thaliana* mutant *ys1ys3*. Its physiological function is transporting metals, very likely iron, to the nodule, as suggested by its localization in the vasculature and the reduction of nitrogenase activity in *MtYSL8* mutant plants

7.- Although MtYSL8 is primarily involved in metal delivery to nodules, it is not seem to be essential for metal delivery to other plant organs under non-symbiotic conditions. As it happens in *A. thaliana*, another functionally redundant YSL protein might be functioning.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany, S. E., Muller-Moule, P., Niyogi, K. K., Pilon, M. & Shikanai, T. (2005) 'Two P-type ATPases are required for copper delivery in Arabidopsis thaliana chloroplasts', *Plant Cell*, 17(4), pp. 1233-51.
- Abreu, I., Saez, A., Castro-Rodriguez, R., Escudero, V., Rodriguez-Haas, B., Senovilla, M., Larue, C., Grolimund, D., Tejada-Jimenez, M., Imperial, J. & Gonzalez-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* Zinc-Iron Permease6 provides zinc to rhizobia-infected nodule cells', *Plant Cell Environ.*
- Agarwala, S., Bisht, S. & Sharma, C. (1977) 'Relative effectiveness of certain heavy metals in producing toxicity and symptoms of iron deficiency in barley', *Can J Bot*, 55(10), pp. 1299-1307.
- 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', *J Biol Chem*, 279(51), pp. 53435-41.
- Aller, S. G. & Unger, V. M. (2006) 'Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-A resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10), pp. 3627-32.
- Alvarez-Fernández, A., Díaz-Benito, P., Abadía, A., López-Millán, A. F. & Abadía, J. (2014) 'Metal species involved in long distance metal transport in plants', *Front Plant Sci*, 5, pp. 105.
- Andaluz, S., Rodríguez-Celma, J., Abadía, A., Abadía, J. & López-Millán, A. F. (2009) 'Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiencyTime course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency', *Plant Physiol Biochem*, 47(11-12), pp. 1082-8.
- Anderegg, G. & Ripperger, H. (1989) 'Correlation between metal complex formation and biological activity of nicotianamine analogues', *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (10), pp. 647-650.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Puig, S. & Peñarrubia, L. (2006) 'The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots', *Plant J*, 45(2), pp. 225-36.

- Antala, S., Ovchinnikov, S., Kamisetty, H., Baker, D. & Dempski, R. E. (2015) 'Computation and functional studies provide a model for the structure of the zinc transporter hZIP4', *J Biol Chem*, 290(29), pp. 17796-805.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004) 'Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction', *Annu Rev Plant Biol*, 55, pp. 373-99.
- Appleby, C. A. (1984) 'Leghemoglobin and Rhizobium respiration', *Ann Rev Plant Physiol*, 35(1), pp. 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), pp. 233-48.
- Argüello, J. M., Raimunda, D. & González-Guerrero, M. (2012) 'Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry', *J Biol Chem*, 287(17), pp. 13510-13517.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D. M. & Kaplan, J. (1994) 'The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake', *Cell*, 76(2), pp. 403-10.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. 1995. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons ed.: Inc., New York, N.Y.
- Avenhaus, U., Cabeza, R. A., Liese, R., Lingner, A., Dittert, K., Salinas-Riester, G., Pommerenke, C. & Schulze, J. (2016) 'Short-term molecular acclimation processes of legume nodules to increased external oxygen concentration', *Front Plant Sci*, 6, pp. 1133.
- Ayre, B. G. (2011) 'Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning', *Mol Plant*, 4(3), pp. 377-94.
- Baral, B., Teixeira da Silva, J. A. & Izaguirre-Mayoral, M. L. (2016) 'Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides', *J Plant Physiol*, 193, pp. 97-109.
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M. & Finan, T. M. (1996) 'A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*', *J Bacteriol*, 178(15), pp. 4540-7.

- Bardin, S. D., Voegelé, R. T. & Finan, T. M. (1998) 'Phosphate assimilation in *Rhizobium* (Sinorhizobium) meliloti: identification of a pit-like gene', *J Bacteriol*, 180(16), pp. 4219-26.
- Bashir, K., Ishimaru, Y., Itai, R. N., Senoura, T., Takahashi, M., An, G., Oikawa, T., Ueda, M., Sato, A., Uozumi, N., Nakanishi, H. & Nishizawa, N. K. (2015) 'Iron deficiency regulated OsOPT7 is essential for iron homeostasis in rice', *Plant Mol Biol*, 88(1-2), pp. 165-76.
- Bassett, B., Goodman, R. & Novacky, A. (1977) 'Ultrastructure of soybean nodules. I: release of rhizobia from the infection thread', *Can J Microbiol*, 23(5), pp. 573-582.
- Baxter, I., Muthukumar, B., Park, H. C., Buchner, P., Lahner, B., Danku, J., Zhao, K., Lee, J., Hawkesford, M. J., Guerinot, M. L. & Salt, D. E. (2008) 'Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1)', *PLoS Genet*, 4(2), pp. e1000004.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M. R., Boutry, M., Palmgren, M. G., Gribskov, M., Harper, J. F. & Axelsen, K. B. (2003) 'Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice', *Plant Physiol*, 132(2), pp. 618-28.
- Beadle, G. W. (1929) 'Yellow stripe-A factor for chlorophyll deficiency in maize located in the Pr chromosome', *Am Nat*, 63(685), pp. 189-192.
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M. & Dalton, D. A. (2010) 'Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules', *New Phytol*, 188(4), pp. 960-76.
- Becana, M. & Rodríguez-Barrueco, C. (1989) 'Protective mechanisms of nitrogenase against oxygen excess and partially-reduced oxygen intermediates', *Physiol Plant*, 75(3), pp. 429-438.
- Benedito, V. A., Dai, X., He, J., Zhao, P. X. & Udvardi, M. K. (2006) 'Functional genomics of plant transporters in legume nodules', *Funct Plant Biol*, 33(8), pp. 731-736.
- Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andrianakaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P. X., Tang, Y. & Udvardi, M. K. (2008) 'A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*', *Plant J*, 55(3), pp. 504-13.

- Beringer, J. (1974) 'R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*', *Microbiology*, 84(1), pp. 188-198.
- Bernard, P. & Couturier, M. (1992) 'Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes', *J Mol Biol*, 226(3), pp. 735-745.
- Bertani, G. (1951) 'Studies on lysogenesis I.: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*1', *J Bacteriol*, 62(3), pp. 293.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. & Barker, D. G. (2001) '*Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations', *Mol Plant Microbe Interact*, 14(6), pp. 695-700.
- Bond, L. (1948) 'Origin & development morphology of root nodules of *Pisum sativum*', *Bot Gaz*, 109(4), pp. 411-434.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S. & Bachhawat, A. K. (2000) 'Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *J Biol Chem*, 275(18), pp. 13259-65.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & Boeke, J. D. (1998) 'Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications', *Yeast*, 14(2), pp. 115-32.
- Brewin, N. J. (1998) 'Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes', in Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.) *The Rhizobiaceae*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 417-429.
- Brewin, N. J. (2004) 'Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis', *CRC Crit Rev Plant Sci*, 23(4), pp. 293-316.
- Brito, B., Palacios, J. M., Hidalgo, E., Imperial, J. & Ruíz-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', *J Bacteriol*, 176(17), pp. 5297-303.

- Brown, S. M. & Walsh, K. B. (1994) 'Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability', *Funct Plant Biol*, 21(1), pp. 49-68.
- Brundrett, M. C., Enstone, D. E. & Peterson, C. A. (1988) 'A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue', *Protoplasma*, 146(2-3), pp. 133-142.
- 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), pp. 1309-1318.
- Cagnac, O., Bourbonloux, A., Chakrabarty, D., Zhang, M. Y. & Delrot, S. (2004) 'AtOPT6 transports glutathione derivatives and is induced by primisulfuron', *Plant Physiol*, 135(3), pp. 1378-87.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J. F., Mari, S. & Curie, C. (2009) 'The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity', *Biochem J*, 422(2), pp. 217-28.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J. F., Mari, S. & Curie, C. (2010) 'High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions', *Plant Cell*, 22(3), pp. 904-17.
- Charrier, B., Coronado, C., Kondorosi, A. & Ratet, P. (1995) 'Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes', *Plant Mol Biol*, 29(4), pp. 773-86.
- Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998) 'Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*', *J Bacteriol*, 180(19), pp. 5183-91.
- Chu, H. H., Chiecko, J., Punshon, T., Lanzirotti, A., Lahner, B., Salt, D. E. & Walker, E. L. (2010) 'Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures', *Plant Physiol*, 154(1), pp. 197-210.
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998) 'Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*', *Plant J*, 16(6), pp. 735-43.

- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. (2002) 'Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis', *Annu Rev Plant Biol*, 53, pp. 159-82.
- Collier, R. & Tegeder, M. (2012) 'Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export', *Plant J*, 72(3), pp. 355-67.
- Conte, S. S., Chu, H. H., Rodríguez, D. C., Punshon, T., Vasques, K. A., Salt, D. E. & Walker, E. L. (2013) '*Arabidopsis thaliana* Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis', *Front Plant Sci*, 4, pp. 283.
- Conte, S. S. & Walker, E. L. (2012) 'Genetic and biochemical approaches for studying the yellow stripe-like transporter family in plants', *Curr Top Membr*, 69, pp. 295-322.
- Cubillas, C., Vinuesa, P., Tabche, M. L., Dávalos, A., Vázquez, A., Hernández-Lucas, I., Romero, D. & García-de los Santos, A. (2014) 'The cation diffusion facilitator protein EmfA of *Rhizobium etli* belongs to a novel subfamily of Mn^{2+}/Fe^{2+} transporters conserved in α -proteobacteria', *Metallomics*, 6(10), pp. 1808-1815.
- Cubillas, C., Vinuesa, P., Tabche, M. L. & García-de los Santos, A. (2013) 'Phylogenomic analysis of cation diffusion facilitator proteins uncovers Ni^{2+}/Co^{2+} transporters', *Metallomics*, 5(12), pp. 1634-1643.
- Cun, P., Sarrobert, C., Richaud, P., Chevalier, A., Soreau, P., Auroy, P., Gravot, A., Baltz, A., Leonhardt, N. & Vavasseur, A. (2014) 'Modulation of Zn/Cd P(1B2)-ATPase activities in *Arabidopsis* impacts differently on Zn and Cd contents in shoots and seeds', *Metallomics*, 6(11), pp. 2109-16.
- Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R. & Briat, J. F. (2000) 'Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport', *Biochem J*, 347 Pt 3, pp. 749-55.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. & Mari, S. (2009) 'Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and Yellow Stripe 1-like transporters', *Ann Bot*, 103(1), pp. 1-11.

- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F. & Walker, E. L. (2001) 'Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake', *Nature*, 409(6818), pp. 346-9.
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. & Klausner, R. D. (1994) 'Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport', *Cell*, 76(2), pp. 393-402.
- Day, D. & Copeland, L. (1991) 'Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules', *Plant Physiol Biochem*, 29(2), pp. 185-201.
- Dazzo, F. (1982) 'Leguminous root nodules'.
- de Faria, S., Lewis, G., Sprent, J. & Sutherland, J. (1989) 'Occurrence of nodulation in the *Leguminosae* Occurrence of nodulation in the Leguminosae', *New Phytol*, 111(4), pp. 607-619.
- de Billy, F., Barker, D. G., Gallusci, P. & Truchet, G. (1991) 'Leghaemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa', *Plant J*, 1(1), pp. 27-35.
- Dean, R. M., Rivers, R. L., Zeidel, M. L. & Roberts, D. M. (1999) 'Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties', *Biochemistry*, 38(1), pp. 347-53.
- 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 Res*, 13(13), pp. 4777-4788.
- 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(Pt 1), pp. 199-207.
- Desbrosses, G., Kopka, C., Ott, T. & Udvardi, M. K. (2004) 'Lotus japonicus LjKUP is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane', *Mol Plant Microbe Interact*, 17(7), pp. 789-97.

- Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voigt, K., Schroder, A., Arrivault, S., Thomine, S. & Kramer, U. (2005) 'Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation', *FEBS Lett*, 579(19), pp. 4165-74.
- DiDonato, R. J., Jr., Roberts, L. A., Sanderson, T., Easley, R. B. & Walker, E. L. (2004) 'Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes', *Plant J*, 39(3), pp. 403-14.
- Divol, F., Couch, D., Conejero, G., Roschztardtz, H., Mari, S. & Curie, C. (2013) 'The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast', *Plant Cell*, 25(3), pp. 1040-55.
- 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*', *J Biol Chem*, 269(42), pp. 26092-9.
- Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C. & Dixon, R. (2012) 'Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes', *BMC Genomics*, 13, pp. 162.
- Downie, J. A. (2010) 'The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots', *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), pp. 150-70.
- Durrett, T. P., Gassmann, W. & Rogers, E. E. (2007) 'The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation', *Plant Physiol*, 144(1), pp. 197-205.
- Ehrnstorfer, I. A., Geertsma, E. R., Pardon, E., Steyaert, J. & Dutzler, R. (2014) 'Crystal structure of a SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for transition-metal ion transport', *Nat Struct Mol Biol*, 21(11), pp. 990-6.
- Ehrnstorfer, I. A., Manatschal, C., Arnold, F. M., Laederach, J. & Dutzler, R. (2017) 'Structural and mechanistic basis of proton-coupled metal ion transport in the SLC11/NRAMP family', *Nat Commun*, 8, pp. 14033.

- Eichner, M. J. (1990) 'Nitrous oxide emissions from fertilized soils: summary of available data', *J Environ Qual*, 19(2), pp. 272-280.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. & Guerinot, M. L. (1996) 'A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11), pp. 5624-8.
- Eisses, J. F., Chi, Y. & Kaplan, J. H. (2005) 'Stable plasma membrane levels of hCTR1 mediate cellular copper uptake', *J Biol Chem*, 280(10), pp. 9635-9.
- Emerich, D. W., Ruiz-Argueso, T., Ching, T. M. & Evans, H. J. (1979) 'Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids', *J Bacteriol*, 137(1), pp. 153-60.
- Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D. & Saier, M. H., Jr. (1998) 'Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins', *J Membr Biol*, 166(1), pp. 1-7.
- Eroglu, S., Giehl, R. F. H., Meier, B., Takahashi, M., Terada, Y., Ignatiev, K., Andresen, E., Kupper, H., Peiter, E. & von Wiren, N. (2017) 'Metal Tolerance Protein 8 mediates manganese homeostasis and iron re-allocation during seed development and germination', *Plant Physiol*.
- Eroglu, S., Meier, B., von Wiren, N. & Peiter, E. (2016) 'The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 170(2), pp. 1030-45.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. & Emons, A. M. (2003) 'Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application', *Plant Physiol*, 132(4), pp. 1982-8.
- Feng, H., An, F., Zhang, S., Ji, Z., Ling, H. Q. & Zuo, J. (2006) 'Light-regulated, tissue-specific, and cell differentiation-specific expression of the *Arabidopsis* Fe(III)-chelate reductase gene *AtFRO6*', *Plant Physiol*, 140(4), pp. 1345-54.
- Finkelstein, J. (2009) 'Metalloproteins', *Nature*, 460(7257), pp. 813.

- Flemetakis, E., Dimou, M., Cotzur, D., Efrose, R. C., Aivalakis, G., Colebatch, G., Udvardi, M. & Katinakis, P. (2003) 'A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during Lotus japonicus nodule development', *J Exp Bot*, 54(388), pp. 1789-91.
- 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 Phytol*, 211(3), pp. 1129-41.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. & Voss, M. (2013) 'The global nitrogen cycle in the twenty-first century', *Phil Trans R Soc B Biol Sci*, 368(1621).
- Frink, C. R., Waggoner, P. E. & Ausubel, J. H. (1999) 'Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect', *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(4), pp. 1175-1180.
- Gaither, L. A. & Eide, D. J. (2000) 'Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter', *J Biol Chem*, 275(8), pp. 5560-4.
- Gaither, L. A. & Eide, D. J. (2001) 'Eukaryotic zinc transporters and their regulation', *Biomaterials*, 14(3-4), pp. 251-70.
- Gao, C. Y. & Pinkham, J. L. (2000) 'Tightly regulated, beta-estradiol dose-dependent expression system for yeast', *Biotechniques*, 29(6), pp. 1226-31.
- Gaude, N., Tippmann, H., Flemetakis, E., Katinakis, P., Udvardi, M. & Dormann, P. (2004) 'The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus', *J Biol Chem*, 279(33), pp. 34624-30.
- Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. (1991) 'Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier', *Yeast*, 7(3), pp. 253-63.
- González-Guerrero, M., Escudero, V., Sáez, A. & Tejada-Jiménez, M. (2016) 'Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia', *Front Plant Sci*, 7, pp. 1088.

- Gordon, A. J., Minchin, F. R., James, C. L. & Komina, O. (1999) 'Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation', *Plant Physiol*, 120(3), pp. 867-78.
- Graham, P. H. & Vance, C. P. (2003) 'Legumes: importance and constraints to greater use', *Plant Physiol*, 131(3), pp. 872-877.
- 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', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), pp. 7220-4.
- Grotz, N. & Guerinot, M. L. (2006) 'Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants', *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), pp. 595-608.
- Gruber, N. & Galloway, J. N. (2008) 'An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle', *Nature*, 451(7176), pp. 293-6.
- Guenther, J. F. & Roberts, D. M. (2000) 'Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules', *Planta*, 210(5), pp. 741-8.
- Guerinot, M. (1991) 'Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses', *Plant Soil*, 130(1), pp. 199-209.
- Guerinot, M. L. (2000) 'The ZIP family of metal transporters', *Biochim Biophys Acta*, 1465(1-2), pp. 190-8.
- Guerinot, M. L., Meidl, E. J. & Plessner, O. (1990) 'Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*', *J Bacteriol*, 172(6), pp. 3298-303.
- Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. (2009) 'Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective', *Electrophoresis*, 30 Suppl 1, pp. S162-73.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. & Hediger, M. A. (1997) 'Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter', *Nature*, 388(6641), pp. 482-8.
- Gupta, S., Chai, J., Cheng, J., D'Mello, R., Chance, M. R. & Fu, D. (2014) 'Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport', *Nature*, 512(7512), pp. 101-4.

- Gutiérrez, R. A. (2012) 'Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition', *Science*, 336(6089), pp. 1673-5.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. & James, E. K. (2011) 'Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects', *Mol Plant Microbe Interact*, 24(11), pp. 1276-88.
- Hakoyama, T., Niimi, K., Yamamoto, T., Isobe, S., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Kumagai, H., Umehara, Y., Brossuleit, K., Petersen, T. R., Sandal, N., Stougaard, J., Udvardi, M. K., Tamaoki, M., Kawaguchi, M., Kouchi, H. & Suganuma, N. (2012) 'The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules', *Plant Cell Physiol*, 53(1), pp. 225-36.
- Hall, J. L. & Williams, L. E. (2003) 'Transition metal transporters in plants', *J Exp Bot*, 54(393), pp. 2601-13.
- Hanahan, D. (1983) 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *J Mol Biol*, 166(4), pp. 557-80.
- Hansch, R. & Mendel, R. R. (2009) 'Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)', *Curr Opin Plant Biol*, 12(3), pp. 259-66.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. & Burns, R. C. (1968) 'The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation', *Plant Physiol*, 43(8), pp. 1185-207.
- Herridge, D. F. (2008) 'Inoculation technology for legumes', in Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. & Newton, W.E. (eds.) *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 77-115.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B. & Boddey, R. M. (2008) 'Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems', *Plant Soil*, 311(1), pp. 1-18.
- Hirel, B., Tétu, T., Lea, P. J. & Dubois, F. (2011) 'Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture', *Sustainability*, 3(9), pp. 1452.

- Hirsch, P. R. & Mauchline, T. H. (2015) 'The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition', *Adv Appl Microbiol*, 93, pp. 45-71.
- Hofstetter, S. S., Dudnik, A., Widmer, H. & Dudler, R. (2013) 'Arabidopsis YELLOW STRIPE-LIKE7 (YSL7) and YSL8 transporters mediate uptake of Pseudomonas virulence factor syringolin A into plant cells', *Mol Plant Microbe Interact*, 26(11), pp. 1302-11.
- Hosie, A. H., Allaway, D., Galloway, C. S., Dunsby, H. A. & Poole, P. S. (2002) 'Rhizobium leguminosarum has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family', *J Bacteriol*, 184(15), pp. 4071-80.
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J. F. & Cobbett, C. S. (2004) 'P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis', *Plant Cell*, 16(5), pp. 1327-39.
- Hwang, J. H., Ellingson, S. R. & Roberts, D. M. (2010) 'Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel', *FEBS Lett*, 584(20), pp. 4339-43.
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., Nakazono, M., Nakanishi, H., Mori, S. & 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', *J Biol Chem*, 284(6), pp. 3470-9.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987) 'GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants', *EMBO J*, 6(13), pp. 3901-7.
- Jeong, J., Merkovich, A., Clyne, M. & Connolly, E. L. (2017) 'Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation', *Curr Opin Plant Biol*, 39, pp. 106-113.
- Jiao, J., Wu, L. J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X. X., Guo, H. J., Liu, L. X., Chen, W. X., Zhang, Z. & Tian, C. F. (2016) 'MucR Is Required for Transcriptional Activation of Conserved Ion Transporters to Support Nitrogen Fixation of Sinorhizobium fredii in Soybean Nodules', *Mol Plant Microbe Interact*, 29(5), pp. 352-61.

- Kaiser, B. N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., Puppo, A. & Day, D. A. (2003) 'The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport', *Plant J*, 35(3), pp. 295-304.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D. & Van Montagu, M. (1995) 'Molecular characterization of a putative Arabidopsis thaliana copper transporter and its yeast homologue', *J Biol Chem*, 270(47), pp. 28479-86.
- Kant, S., Bi, Y.-M. & Rothstein, S. J. (2010) 'Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency', *J Exp Bot*, 62(4), pp. 1499-1509.
- Kereszt, A., Mergaert, P. & Kondorosi, E. (2011) 'Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims?', *Mol Plant-Microbe Interact*, 24(11), pp. 1300-1309.
- Kim, H., Wu, X. & Lee, J. (2013) 'SLC31 (CTR) family of copper transporters in health and disease', *Mol Aspects Med*, 34(2-3), pp. 561-70.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kaplan, J. & Guerinot, M. L. (2006) 'Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1', *Science*, 314(5803), pp. 1295-8.
- King, B. J., Hunt, S., Weagle, G. E., Walsh, K. B., Pottier, R. H., Canvin, D. T. & Layzell, D. B. (1988) 'Regulation of O₂ concentration in soybean nodules observed by in situ spectroscopic measurement of leghemoglobin oxygenation', *Plant Physiol*, 87(2), pp. 296-299.
- 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), pp. 1749-58.
- Kobayashi, T. & Nishizawa, N. K. (2012) 'Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants', *Annu Rev Plant Biol*, 63, pp. 131-52.
- Koh, S., Wiles, A. M., Sharp, J. S., Naider, F. R., Becker, J. M. & Stacey, G. (2002) 'An oligopeptide transporter gene family in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 128(1), pp. 21-9.

- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. & Nishizawa, N. K. (2004) 'OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem', *Plant J*, 39(3), pp. 415-24.
- 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), pp. 1283-95.
- 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 Mol Biol*, 40(1), pp. 37-44.
- Krusell, L., Krause, K., Ott, T., Desbrosses, G., Kramer, U., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., James, E. K., Sandal, N., Stougaard, J., Kawaguchi, M., Miyamoto, A., Suganuma, N. and Udvardi, M. K. (2005) 'The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules', *Plant Cell*, 17(5), pp. 1625-36.
- Kryvoruchko, I. S., Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Sosso, D., Pislariu, C. I., Guan, D., Murray, J., Benedito, V. A., Frommer, W. B. & Udvardi, M. K. (2016) 'MtSWEET11, a nodule-specific sucrose transporter of *Medicago truncatula*', *Plant Physiol*, 171(1), pp. 554-65.
- Krämer, U., Talke, I. N. & Hanikenne, M. (2007) 'Transition metal transport', *FEBS Lett*, 581(12), pp. 2263-72.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. & Thomine, S. (2005) 'Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron', *Embo j*, 24(23), pp. 4041-51.
- 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 Physiol*, 150(2), pp. 786-800.
- Lemoine, R. (2000) 'Sucrose transporters in plants: update on function & structure', *Biochim Biophys Acta*, 1465(1-2), pp. 246-62.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. & Denarie, J. (1990) 'Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal', *Nature*, 344(6268), pp. 781-4.

- LeVier, K., Day, D. A. & Guerinot, M. L. (1996) 'Iron uptake by symbiosomes from soybean root nodules', *Plant Physiol*, 111(3), pp. 893-900.
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D. & Kaplan, J. (2001) 'CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast', *J Biol Chem*, 276(31), pp. 29515-9.
- Lin, W., Chai, J., Love, J. & Fu, D. (2010) 'Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB', *J Biol Chem*, 285(50), pp. 39013-20.
- Liu, Z., Li, H., Soleimani, M., Girijashanker, K., Reed, J. M., He, L., Dalton, T. P. & Nebert, D. W. (2008) 'Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking', *Biochem Biophys Res Commun*, 365(4), pp. 814-20.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method', *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A. & Poole, P. S. (2003) 'Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis', *Nature*, 422(6933), pp. 722-6.
- Long, S. R. (1996) 'Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective', *Plant Cell*, 8(10), pp. 1885-98.
- Lu, M. & Fu, D. (2007) 'Structure of the zinc transporter YiiP', *Science*, 317(5845), pp. 1746-8.
- Lubkowitz, M. (2011) 'The oligopeptide transporters: a small gene family with a diverse group of substrates and functions?', *Mol Plant*, 4(3), pp. 407-15.
- 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 Mol Biol*, 54(4), pp. 583-96.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J. & Botstein, D. (1987) 'Plasmid construction by homologous recombination in yeast', *Gene*, 58(2-3), pp. 201-216.
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A. & Eide, D. J. (2002) 'Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*', *J Biol Chem*, 277(42), pp. 39187-94.

- MacLean, A. M., Finan, T. M. & Sadowsky, M. J. (2007) 'Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes', *Plant Physiol*, 144(2), pp. 615-622.
- Mathesius, U., Bayliss, C., Weinman, J. J., Schlaman, H. R. M., Spaink, H. P., Rolfe, B. G., McCully, M. E. & Djordjevic, M. A. (1998) 'Flavonoids synthesized in cortical cells during nodule initiation are early developmental markers in white clover', *Mol Plant-Microbe Interac*, 11(12), pp. 1223-1232.
- 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', *J Exp Bot*, 64(10), pp. 2871-83.
- Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Biskup, R., Garbiec, A. & Marchewka, T. (2015) 'Cucumber metal tolerance protein CsMTP9 is a plasma membrane H⁺-coupled antiporter involved in the Mn²⁺ and Cd²⁺ efflux from root cells', *Plant J*, 84(6), pp. 1045-58.
- Miller, R. W., Yu, Z. & Zarkadas, C. G. (1993) 'The nitrogenase proteins of *Rhizobium meliloti*: purification and properties of the MoFe and Fe components', *Biochim Biophys Acta*, 1163(1), pp. 31-41.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L. & Williams, L. E. (2003) 'Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass', *Plant J*, 35(2), pp. 164-76.
- 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', *J Exp Bot*, 64(1), pp. 369-81.
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. & Obata, H. (2005) 'Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities', *Plant Physiol Bioch*, 43(8), pp. 793-801.
- Mohd Noor, S. N., Day, D. A. & Smith, P. M. (2015) 'The symbiosome membrane', *Biological Nitrogen Fixation*: John Wiley & Sons, Inc, pp. 683-694.

- 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, pp. 107.
- Moreau, S., Thomson, R. M., Kaiser, B. N., Trevaskis, B., Guerinot, M. L., Udvardi, M. K., Puppo, A. & Day, D. A. (2002) 'GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean', *J Biol Chem*, 277(7), pp. 4738-46.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A. & Richaud, P. (2009) 'AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 149(2), pp. 894-904.
- Morrissey, J., Baxter, I. R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D. E. & Guerinot, M. L. (2009) 'The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis', *Plant Cell*, 21(10), pp. 3326-38.
- Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Hentze, M. W. (2008) 'Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network', *Annu Rev Nutr*, 28, pp. 197-213.
- 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), pp. 1178-90.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) 'A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures', *Physiol Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Murata, Y., Ma, J. F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K. & Iwashita, T. (2006) 'A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots', *Plant J*, 46(4), pp. 563-72.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. & Kimura, T. (2007) 'Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation', *J Biosci Bioeng*, 104(1), pp. 34-41.
- Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenfuhr, A. (2007) 'A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants', *Plant J*, 51(6), pp. 1126-36.

- Nevo, Y. & Nelson, N. (2006) 'The NRAMP family of metal-ion transporters', *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), pp. 609-20.
- Niemietz, C. M. & Tyerman, S. D. (2000) 'Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules', *FEBS Lett*, 465(2-3), pp. 110-4.
- Nose, Y., Rees, E. M. & Thiele, D. J. (2006) 'Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture', *Trends Biochem Sci*, 31(11), pp. 604-7.
- O'Hara, G. W. (2001) 'Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review', *Aust J Exp Agr*, 41(3), pp. 417-433.
- O'Hara, G. W., Boonkerd, N. & Dilworth, M. J. (1988) 'Mineral constraints to nitrogen fixation', *Plant Soil*, 108(1), pp. 93-110.
- Oldroyd, G. E. (2013) 'Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants', *Nat Rev Microbiol*, 11(4), pp. 252-63.
- Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2008) 'Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes', *Annu Rev Plant Biol*, 59, pp. 519-46.
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S. & Downie, J. A. (2011) 'The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis', *Annu Rev Genet*, 45, pp. 119-44.
- Oomen, R. J., Wu, J., Lelievre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M. G. & Thomine, S. (2009) 'Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*', *New Phytol*, 181(3), pp. 637-50.
- Palmer, C. M. & Guerinot, M. L. (2009) 'Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants', *Nat Chem Biol*, 5(5), pp. 333-40.
- Patel, S. J., Padilla-Benavides, T., Collins, J. M. & Arguello, J. M. (2014) 'Functional diversity of five homologous Cu⁺-ATPases present in *Sinorhizobium meliloti*', *Microbiology*, 160(Pt 6), pp. 1237-51.
- Patrick, J. W. (1997) 'Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, pp. 191-222.

- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Herouart, D., Frendo, P. & Puppo, A. (2006) 'Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis', *J Exp Bot*, 57(8), pp. 1769-76.
- Peiter, E. & Schubert, S. (2003) 'Sugar uptake and proton release by protoplasts from the infected zone of *Vicia faba* L. nodules: evidence against apoplastic sugar supply of infected cells', *J Exp Bot*, 54(388), pp. 1691-700.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. & Bedmar, E. J. (2015) 'Bacterial associations with legumes', *Crit Rev Plant Sci* 34(1-3), pp. 17-42.
- Pelissier, H. C., Frerich, A., Desimone, M., Schumacher, K. & Tegeder, M. (2004) 'PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean', *Plant Physiol*, 134(2), pp. 664-75.
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Dakora, F. D., Bhattarai, S., Maskey, S. L., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D. F., Hauggaard-Nielsen, H. & Jensen, E. S. (2009) 'The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems', *Symbiosis*, 48(1), pp. 1-17.
- Peris-Peris, C., Serra-Cardona, A., Sánchez-Sanuy, F., Campo, S., Arino, J. & San Segundo, B. (2017) 'Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice', *Mol Plant Microbe Interact*, 30(5), pp. 385-398.
- Peñarrubia, L., Andrés-Colás, N., Moreno, J. & Puig, S. (2010) 'Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator?', *J Biol Inorg Chem*, 15(1), pp. 29-36.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P. & van der Putten, W. H. (2013) 'Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere', *Nat Rev Microbiol*, 11(11), pp. 789-99.
- Pich, A. & Scholz, G. (1996) 'Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem', *J Exp Bot*, 47(1), pp. 41-47.
- Pilon, M., Cohu, C. M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S. E. & Gaymard, F. (2009) 'Essential transition metal homeostasis in plants', *Curr Opin Plant Biol*, 12(3), pp. 347-57.

- Popp, C. & Ott, T. (2011) 'Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis', *Curr Opin Plant Biol*, 14(4), pp. 458-467.
- Preisig, O., Anthamatten, D. & Hennecke, H. (1993) 'Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), pp. 3309-13.
- Preisig, O., Zufferey, R. & Hennecke, H. (1996a) 'The *Bradyrhizobium japonicum* fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase', *Arch Microbiol*, 165(5), pp. 297-305.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C. A. & Hennecke, H. (1996b) 'A high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*', *J Bacteriol*, 178(6), pp. 1532-8.
- Prell, J., Bourdes, A., Kumar, S., Lodwig, E., Hosie, A., Kinghorn, S., White, J. & Poole, P. (2010) 'Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses', *PLoS One*, 5(11), pp. e13933.
- Prell, J., White, J. P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R. J. & Poole, P. S. (2009) 'Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(30), pp. 12477-82.
- Przybyła, A. E., Robbins, J., Menon, N. & Peck, H. D., Jr. (1992) 'Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases', *FEMS Microbiol Rev*, 8(2), pp. 109-35.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M. & Thiele, D. J. (2002) 'Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake', *J Biol Chem*, 277(29), pp. 26021-30.
- Puig, S. & Thiele, D. J. (2002) 'Molecular mechanisms of copper uptake and distribution', *Curr Opin Chem Biol*, 6(2), pp. 171-80.
- Raimunda, D. & Elso-Berberian, G. (2014) 'Functional characterization of the CDF transporter SMc02724 (SmYiIP) in *Sinorhizobium meliloti*: Roles in manganese homeostasis and nodulation', *Biochim Biophys Acta*, 1838(12), pp. 3203-11.

- Raun, W. R. & Johnson, G. V. (1999) 'Improving nitrogen use efficiency for cereal production', *Agron J*, 91(3), pp. 357-363.
- Recourt, K., van Tunen, A. J., Mur, L. A., van Brussel, A. A., Lugtenberg, B. J. & Kijne, J. W. (1992) 'Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*', *Plant Mol Biol*, 19(3), pp. 411-20.
- Reid, C. J. & Poole, P. S. (1998) 'Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*', *J Bacteriol*, 180(10), pp. 2660-9.
- Reinders, A., Sivitz, A. B., Starker, C. G., Gantt, J. S. & Ward, J. M. (2008) 'Functional analysis of LJSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*', *Plant Mol Biol*, 68(3), pp. 289-99.
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J. A., García-Alonso, J. I., Abadía, J. & 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 Cell Physiol*, 51(1), pp. 91-102.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. & Frommer, W. B. (1995) 'NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*', *FEBS Lett*, 370(3), pp. 264-8.
- Ricachenevsky, F. K., Menguer, P. K., Sperotto, R. A., Williams, L. E. & Fett, J. P. (2013) 'Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies', *Front Plant Sci*, 4, pp. 144.
- Robertson, G. P. & Vitousek, P. M. (2009) 'Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource', *Ann Rev Environ Resour*, 34, pp. 97-125.
- 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), pp. 1247-53.

- Rogers, E. E. & Guerinot, M. L. (2002) 'FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 14(8), pp. 1787-99.
- Roschttardt, H., Conejero, G., Curie, C. & Mari, S. (2009) 'Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo', *Plant Physiol*, 151(3), pp. 1329-38.
- Roth, L. E. & Stacey, G. (1989) 'Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources', *Eur J Cell Biol*, 49(1), pp. 13-23.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrere, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C. & Gamas, P. (2014) 'An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing', *Plant J*, 77(6), pp. 817-37.
- Rubio, M. C., Becana, M., Sato, S., James, E. K., Tabata, S. & Spink, H. P. (2007) 'Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*', *Mol Plant-Microbe Interact*, 20(3), pp. 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', *Mol Plant Microbe Interact*, 17(12), pp. 1294-305.
- Ruiz-Argüeso, T., Emerich, D. W. & Evans, H. J. (1979) 'Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage', *Biochem Biophys Res Commun*, 86(2), pp. 259-64.
- Saier, M. H., Jr., Reddy, V. S., Tamang, D. G. & Vastermark, A. (2014) 'The transporter classification database', *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), pp. D251-8.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006) 'Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pp. pdb. prot3932.

- 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', *J Biol Chem*, 279(15), pp. 15348-55.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J. & Peñarrubia, L. (2003) 'Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana', *Plant Mol Biol*, 51(4), pp. 577-87.
- Sankari, S. & O'Brian, M. R. (2016) 'The *Bradyrhizobium japonicum* ferrous iron transporter FeoAB is required for ferric iron utilization in free living aerobic cells and for symbiosis', *J Biol Chem*, 291(30), pp. 15653-62.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. & Ma, J. F. (2012) 'Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice', *Plant Cell*, 24(5), pp. 2155-67.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. & Young, J. M. (2003) 'Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts', *J Gen Appl Microbiol*, 49(3), pp. 155-179.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A. R., Kirchner, S., Wipf, D. & von Wirén, N. (2006) 'AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots', *J Biol Chem*, 281(35), pp. 25532-40.
- 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', *J Biol Chem*, 279(10), pp. 9091-6.
- Schaaf, G., Schikora, A., Haberle, J., Vert, G., Ludewig, U., Briat, J. F., Curie, C. & von Wirén, N. (2005) 'A putative function for the Arabidopsis Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis', *Plant Cell Physiol*, 46(5), pp. 762-74.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012) 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods*, 9(7), pp. 676-82.
- Schmidt, P. E., Broughton, W. J. & Werner, D. (1994) 'Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate', *Mol Plant-Microbe Interac*, 7(3), pp. 384-390.

- Seliga, H. (1993) 'The role of copper in nitrogen fixation in *Lupinus luteus* L', *Plant Soil*, 155(1), pp. 349-352.
- Senovilla, M., Castro-Rodríguez, R., Abreu, I., Escudero, V., Kryvoruchko, I. S., Udvardi, M., Imperial, J. & González-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* copper transporter1 (MtCOPT1) delivers copper for symbiotic nitrogen fixation', *bioRxiv*, pp. 104554.
- 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., Muller-Moule, P., Munekage, Y., Niyogi, K. K. & Pilon, M. (2003) 'PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts', *Plant Cell*, 15(6), pp. 1333-46.
- Simon-Rosin, U., Wood, C. & Udvardi, M. K. (2003) 'Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*', *Plant Mol Biol*, 51(1), pp. 99-108.
- Slatni, T., Vigani, G., Salah, I. B., Kouas, S., Dell'Orto, M., Gouia, H., Zocchi, G. & Abdelly, C. (2011) 'Metabolic changes of iron uptake in N₂-fixing common bean nodules during iron deficiency', *Plant Sci*, 181(2), pp. 151-8.
- Smil, V. (1999) 'Nitrogen in crop production: An account of global flows', *Global biogeochem cycles*, 13(2), pp. 647-662.
- Smith, A. T., Ross, M. O., Hoffman, B. M. & Rosenzweig, A. C. (2017) 'Metal selectivity of a Cd-, Co-, and Zn-transporting P_{1B}-type ATPase', *Biochemistry*, 56(1), pp. 85-95.
- Smith, A. T., Smith, K. P. & Rosenzweig, A. C. (2014) 'Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases', *J Biol Inorg Chem*, 19(6), pp. 947-60.
- Socha, A. L. & Guerinot, M. L. (2014) 'Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants', *Front Plant Sci*, 5, pp. 106.

- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. & Nelson, N. (1996) 'A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), pp. 5105-10.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P. X., Chabaud, M., Ratet, P. & Mysore, K. S. (2008) 'Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*', *Plant J*, 54(2), pp. 335-47.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Nakanishi, H. & Nishizawa, N. K. (2011) 'Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice', *Plant Signal Behav*, 6(11), pp. 1813-6.
- Takanashi, K., Yokosho, K., Saeki, K., Sugiyama, A., Sato, S., Tabata, S., Ma, J. F. & Yazaki, K. (2013) 'LJMATE1: a citrate transporter responsible for iron supply to the nodule infection zone of *Lotus japonicus*', *Plant Cell Physiol*, 54(4), pp. 585-94.
- Tang, C., Robson, A., Dilworth, M. & Kuo, J. (1992) 'Microscopic evidence on how iron deficiency limits nodule initiation in *Lupinus angustifolius* L.', *New Phytol*, 121(3), pp. 457-467.
- Tang, C., Robson, A. D. & Dilworth, M. J. (1990) 'The role of iron in nodulation and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L', *New Phytol*, 114(2), pp. 173-182.
- Tang, C., Robson, A. D. & Dilworth, M. J. (1991) 'Which stage of nodule initiation in *Lupinus angustifolius* L. is sensitive to iron deficiency?', *New Phytol*, 117(2), pp. 243-250.
- Tejada-Jiménez, M., Gil-Díez, P., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K. S., Imperial, J. & González-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency', *New Phytol*.
- Tejada-Jiménez, M., Llamas, A., Sanz-Luque, E., Galván, A. & Fernández, E. (2007) 'A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(50), pp. 20126-30.
- 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*: Springer, pp. 265-270.

- Thomine, S., Lelievre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J. I. & Barbier-Brygoo, H. (2003) 'AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency', *Plant J*, 34(5), pp. 685-95.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M. & Schroeder, J. I. (2000) 'Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), pp. 4991-6.
- Tiwari, M., Sharma, D., Dwivedi, S., Singh, M., Tripathi, R. D. & Trivedi, P. K. (2014) 'Expression in Arabidopsis and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, OsNRAMP1, in arsenic transport and tolerance', *Plant Cell Environ*, 37(1), pp. 140-52.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N. & Fujiwara, T. (2007) 'An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47), pp. 18807-12.
- Tyerman, S. D., Whitehead, L. F. & Day, D. A. (1995) 'A channel-like transporter for NH_4^+ on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants', *Nature*, 378(6557), pp. 629.
- Udvardi, M. & Poole, P. S. (2013) 'Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses', *Annu Rev Plant Biol*, 64, pp. 781-805.
- Udvardi, M. K. & Day, D. A. (1997) 'Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules', *Annu Rev Plant Biol*, 48(1), pp. 493-523.
- Ueno, D., Yamaji, N. & Ma, J. F. (2009) 'Further characterization of ferric-phytosiderophore transporters ZmYS1 and HvYS1 in maize and barley', *J Exp Bot*, 60(12), pp. 3513-20.
- 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), pp. e37340.
- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995) 'The Rhizobium-plant symbiosis', *Microbiol Rev*, 59(1), pp. 124-42.

- Vance, C. P. (2008) 'Carbon & nitrogen metabolism in legume nodules', in Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. & Newton, W.E. (eds.) *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 293-320.
- Vance, C. P. & Gantt, J. S. (1992) 'Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules', *Physiol Plant*, 85(2), pp. 266-274.
- Vance, C. P., Graham, P. H. & Allan, D. L. (2000) 'Biological nitrogen fixation: phosphorus - a critical future need?', in Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, G. & Newton, W.E. (eds.) *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 509-514.
- Vance, C. P., Miller, S. S., Driscoll, B. T., Robinson, D. L., Trepp, G., Gantt, J. S. & Samas, D. A. (1998) 'Nodule carbon metabolism: organic acids for N₂ fixation', in Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W.E. (eds.) *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 443-448.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. & Truchet, G. (1990) 'Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules', *J Bacteriol*, 172(8), pp. 4295-306.
- 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), pp. 604-614.
- Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme (By) Blackwell Scientific. Oxford.
- 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', *Plant J*, 33(5), pp. 949-56.
- Waldron, K. J. & Robinson, N. J. (2009) 'How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?', *Nat Rev Microbiol*, 7(1), pp. 25-35.

- Walshaw, D. L. & Poole, P. S. (1996) 'The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes', *Mol Microbiol*, 21(6), pp. 1239-52.
- Waters, B. M., Chu, H. H., Didonato, R. J., Roberts, L. A., Eisley, R. B., Lahner, B., Salt, D. E. & 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 Physiol*, 141(4), pp. 1446-58.
- Watson, R. J. (1990) 'Analysis of the C4-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB*, and *dctD*', *Mol Plant Microbe Interact*, 3(3), pp. 174-81.
- White, J., Prell, J., James, E. K. & Poole, P. (2007) 'Nutrient sharing between symbionts', *Plant Physiol*, 144(2), pp. 604-14.
- White, M. C., Decker, A. M. & Chaney, R. L. (1981) 'Metal complexation in xylem fluid I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate', *Plant Physiol*, 67(2), pp. 292-300.
- 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 Phytol*, 182(1), pp. 49-84.
- White, P. J. & Brown, P. H. (2010) 'Plant nutrition for sustainable development and global health', *Ann Bot*, 105(7), pp. 1073-1080.
- Wise, A. A., Liu, Z. & Binns, A. N. (2006) 'Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*', *Methods Mol Biol*, 343, pp. 43-53.
- Witty, J., Minchin, F., Skot, L. & Sheehy, J. (1986) 'Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules', *Plant Mol Cell Biol*.
- Woodmansee, R. G., Dodd, J. L., Bowman, R. A., Clark, F. E. & Dickinson, C. E. (1978) 'Nitrogen budget of a shortgrass prairie ecosystem', *Oecologia*, 34(3), pp. 363-376.

- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A. & Bisseling, T. (2014) 'Fate map of *Medicago truncatula* root nodules', *Development*, 141(18), pp. 3517-28.
- Xiao, Z. & Wedd, A. G. (2002) 'A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1', *Chem Commun (Camb)*, (6), pp. 588-9.
- Yamaji, N., Sasaki, A., Xia, J. X., Yokosho, K. & Ma, J. F. (2013) 'A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice', *Nat Commun*, 4, pp. 2442.
- Yang, M., Zhang, W., Dong, H., Zhang, Y., Lv, K., Wang, D. & Lian, X. (2013) 'OsNRAMP3 is a vascular bundles-specific manganese transporter that is responsible for manganese distribution in rice', *PLoS One*, 8(12), pp. e83990.
- Yeh, K. Y., Yeh, M. & Glass, J. (2011) 'Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion', *Gastroenterology*, 141(1), pp. 292-9, 299.e1.
- Yen, M. R., Tseng, Y. H. & Saier, M. H., Jr. (2001) 'Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family', *Microbiology*, 147(Pt 11), pp. 2881-3.
- 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 Biol*, 11, pp. 69.
- Yuan, Z. C., Zaheer, R. & Finan, T. M. (2006) 'Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*', *J Bacteriol*, 188(3), pp. 1089-102.
- Yurgel, S. N. & Kahn, M. L. (2004) 'Dicarboxylate transport by rhizobia', *FEMS Microbiol Rev*, 28(4), pp. 489-501.
- Zhai, Z., Gayomba, S. R., Jung, H. I., Vimalakumari, N. K., Pineros, M., Craft, E., Rutzke, M. A., Danku, J., Lahner, B., Punshon, T., Guerinot, M. L., Salt, D. E., Kochian, L. V. & Vatamaniuk, O. K. (2014) 'OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for

- systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 26(5), pp. 2249-2264.
- Zhang, Z., Xie, Q., Jobe, T. O., Kau, A. R., Wang, C., Li, Y., Qiu, B., Wang, Q., Mendoza-Cozatl, D. G. & Schroeder, J. I. (2016) 'Identification of AtOPT4 as a Plant Glutathione Transporter', *Mol Plant*, 9(3), pp. 481-4.
- Zhao, H. & Eide, D. (1996a) 'The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), pp. 2454-8.
- Zhao, H. & Eide, D. (1996b) 'The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*', *J Biol Chem*, 271(38), pp. 23203-10.
- Zhou, H. & Thiele, D. J. (2001) 'Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*', *J Biol Chem*, 276(23), pp. 20529-35.
- Zielazinski, E. L., Gonzalez-Guerrero, M., Subramanian, P., Stemmler, T. L., Arguello, 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), pp. 1614-23.
- Zipfel, C. & Oldroyd, G. E. (2017) 'Plant signalling in symbiosis and immunity', *Nature*, 543(7645), pp. 328-336.
- Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H. & Thony-Meyer, L. (1996) 'Assembly and function of the cytochrome cbb3 oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*', *J Biol Chem*, 271(15), pp. 9114-9.