POLITÉCNICA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
Alimentaria y de Biosistemas

Departamento de Biotecnología - Biología Vegetal

**Homeostasis y transporte de molibdeno en nódulos
de *Medicago truncatula***

TESIS DOCTORAL

Patricia Gil Diez

Graduada en Biología

Madrid, 2019

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

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

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

TESIS DOCTORAL:

**“Homeostasis y transporte de molibdeno en nódulos de
Medicago truncatula”**

Autor:

Patricia Gil Diez
Graduada en Biología

Director:

Manuel González Guerrero
Licenciado en Bioquímica
Doctor en Bioquímica

Co-director:

Manuel Tejada Jiménez
Licenciado en Bioquímica
Doctor en Bioquímica

A mis padres

“Cada aurora (nos dicen) maquina maravillas
capaces de torcer la más terca fortuna”
Jorge Luis Borges

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	ix
ABSTRACT/RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	
1. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO PARA EL CRECIMIENTO VEGETAL	1
2. ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA Y DESARROLLO DEL NÓDULO	2
3. FIJACIÓN SIMBIOTICA DE NITRÓGENO	4
4. METALES EN LA FIJACIÓN SIMBIOTICA DE NITRÓGENO	7
5. TRANSPORTE DE MOLIBDENO	9
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y METODOS	
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	21
1.1. <i>Medicago truncatula</i>	21
1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.4. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	22
1.5. <i>Escherichia coli</i>	22
1.6. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	23
1.7. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIÓN DE RIEGO	23
2.1. Medios y soluciones de riego para el cultivo de plantas	23
2.1.1. Medio Fahreaus	23
2.1.2. Solución Jenner	23
2.2. Medios para el cultivo de levaduras	24
2.2.1. YPD (<i>Yeast-Extract-Peptone-Dextrose</i>)	24
2.2.2. SD (<i>Sinthetic Dextrose</i>)	24
2.3. Medios para el cultivo de bacterias	24
2.3.1. TY (<i>Tryptone Yeast</i>)	24
2.3.2. YMB (<i>Yeast Manitol Broth</i>)	25
2.3.3. LB (<i>Lysogeny Broth</i>)	25
2.3.4. SOC (<i>Super Optimal Broth with catabolite repression</i>)	25
2.3.5. SOB (<i>Super Optimal Broth</i>)	26
2.3.6. TB (<i>Terrific Broth</i>)	26
3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	26
3.1. Extracción de ADN genómico para el genotipado de mutantes de <i>M. truncatula</i>	26
3.2. Extracción de ADN genómico de plantas	27

3.3.	Extracción de ADN plasmídico de bacterias	28
3.4.	Extracción de ADN plasmídico de levaduras	28
3.5.	Extracción de ARN de plantas	29
3.6.	Cuantificación de ADN y ARN	30
3.7.	Electroforesis no desnaturalizante de ácidos nucleicos	30
3.8.	Electroforesis desnaturalizante de ácidos nucleicos	31
3.9.	Recuperación de ADN de geles de agarosa	31
4.	SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	32
5.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	32
5.1.	PCR para la ampliación de fragmentos (no cuantitativa)	32
5.1.1.	PCR para el clonaje de fragmentos de ADN	32
5.1.2.	PCR para la comprobación de fragmentos de ADN	33
5.2.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	35
5.3.	Oligonucleótidos	36
6.	CLONACIÓN	37
6.1.	Vectores usados	37
6.2.	Clonación Gateway	37
6.3.	Clonación por recombinación homologa	37
7.	TRANSFORMACIÓN	39
7.1.	Transformación de células de <i>E. coli</i>	39
7.1.1.	Preparación de células quimiocompetentes	39
7.1.2.	Transformación de células quimiocompetentes	39
7.1.3.	Preparación de células electrocompetentes	40
7.1.4.	Transformación de células electrocompetentes	40
7.2.	Transformación de <i>Agrobacterium</i>	41
7.2.1.	Preparación de células electrocompetentes	41
7.2.2.	Transformación de células electrocompetentes	41
7.3.	Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i>	41
7.4.	Transformación de <i>M. truncatula</i>	42
7.5.	Agrofiltración de <i>N. benthamiana</i>	43
8.	DETECCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BETA-GLUCORONIDASA	44
9.	INMUNOLocalización	45
10.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES	46
11.	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA	46
12.	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA	47
13.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	48
13.1.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	48
14.	WESTERN BLOT	48
14.1.	Electroforesis de proteínas y tinción del gel	48

14.2. Electrotransferencia de proteínas	49
14.3. Inmunodetección de proteínas	49
15. INCLUSIÓN DE NÓDULOS EN LR-WHITE PARA ANÁLISIS DE ESTRUCTURA	50
16. INMUNOLOCALIZACIÓN EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)	51
16.1. Inclusión de nódulos en LR-White	51
16.2. Inmunodetección de muestras para MET	52
17. Bioinformática	52
17.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles	52
17.2. Diseño de oligonucleótidos	54
17.3. Análisis de transcritos de <i>M. truncatula</i>	55
RESULTADOS	
1. TRANSPORTADORES DE MOLINDENO EN <i>M. TRUNCATULA</i>	59
2. MtMOT1.3	63
2.1. MtMOT1.3 es un transportador de molibdato	63
2.2. MtMOT1.3 se expresa en la membrana plasmática de las células de la interzona y zona de fijación de los nódulos	66
2.3. La mutación de <i>MtMOT1.3</i> afecta a la capacidad para fijar nitrógeno en condiciones de simbiosis con <i>S. meliloti</i>	70
2.4. La mutación de <i>MtMOT1.3</i> no afecta a otros procesos en <i>M. truncatula</i>	75
3. MtMOT1.2	77
3.1. MtMOT1.2 es un transportador de molibdato	77
3.2. MtMOT1.2 se expresa en los haces vasculares de raíces y nódulos de <i>M. truncatula</i>	78
3.3. MtMOT1.2 se localiza en células de la endodermis de los nódulos y raíces de <i>M. truncatula</i>	79
3.4. La mutación de MtMOT1.2 afecta a la capacidad para fijar nitrógeno de las plantas de <i>M. truncatula</i> en simbiosis con <i>S. meliloti</i>	83
3.5. La mutación de MtMOT1.2 no afecta al crecimiento de las plantas en condiciones no simbióticas	88
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFIA	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un nódulo indeterminado	5
Figura 2. Representación de la estructura tridimensional de la nitrogenasa y sus cofactores metálicos	6
Figura 3. Representación de las estructuras químicas de los cofactores de molibdeno	10
Figura 4. Esquema que representa las combinaciones de oligonucleótidos usados para la segregación de los mutantes <i>Tnt1</i> de <i>M. truncatula</i>	35
Figura 5. Familia génica de MOT1 en <i>M. truncatula</i>	59
Figura 6. Expresión génica de la familia MOT1 de <i>M. truncatula</i>	62
Figura 7. Expresión de <i>MtMOT1.3</i> en función de la concentración de molibdeno.	63
Figura 8. Test de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> expresando MtMOT1.3.	64
Figura 9. Ensayo de transporte de molibdato de MtMOT1.3	65
Figura 10. Localización tisular de <i>MtMOT1.3</i>	66
Figura 11. Localización subcelular de MtMOT1.3-HA	67
Figura 12. Control de autofluorescencia de la localización subcelular de MtMOT1.3-HA	68
Figura 13. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> con MtMOT1.3-GFP.	69
Figura 14. Inmunodetección de MtMOT1.3 mediante Western Blot.	70
Figura 15. Fenotipo del mutante <i>mot1.3-1</i> en condiciones simbióticas	71
Figura 16. Fenotipo del mutante <i>mot1.3-1</i> en condiciones simbióticas y cultivo hidropónico.	72
Figura 17. Complementación genética de plantas <i>mot1.3-1</i> . transformadas con MtMOT1.3 en condiciones de insuficiencia de molibdeno	73
Figura 18. Desarrollo de los nódulos de plantas control y mutantes <i>mot1.3-1</i>	74
Figura 19 . Expresión de <i>MtMOT1.1</i> , <i>MtMOT1.2</i> , <i>MtMOT1.4</i> y <i>MtMOT1.5</i> en nódulos de 28 dpi de plantas mutantes <i>mot1.3-1</i>	75
Figura 20. Las plantas mutantes <i>mot1.3-1</i> no se diferencian fenotípicamente de las silvestres en condiciones no simbióticas.	76
Figura 21. MtMOT1.2 introduce molibdato al citosol celular	77
Figura 22. Localización tisular de <i>MtMOT1.2</i>	78
Figura 23. Localización subcelular de MtMOT1.2-HA mediante inmunodetección y microscopía confocal	80
Figura 24. Localización subcelular de MtMOT1.2-HA mediante microscopía electrónica de transmisión	81
Figura 25. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> con MtMOT1.3-GFP	82
Figura 26. Línea mutante en el gen MtMOT1.2 por la inserción de <i>Tnt1</i>	83
Figura 27. Fenotipo del mutante <i>mot1.2-1</i> en condiciones simbióticas	84
Figura 28. Desarrollo de los nódulos de plantas control y mutantes <i>mot1.2-1</i>	85
Figura 29. Complementación genética de plantas <i>mot1.2-1</i> transformadas con MtMOT1.2.	86

Figura 30. Fenotipo del mutante <i>mot1.2-1</i> y de segregantes silvestres de la línea NF9961 en condiciones simbióticas.	87
Figura 31. Fenotipo del mutante <i>mot1.2-1</i> en condiciones no simbióticas	88
Figura 32. Fenotipo del mutante <i>mot1.2-1</i> en condiciones no simbióticas y de deficiencia de Mo.	89
Figura 33. Modelo propuesto para el transporte de molibdato desde la raíz hasta las células infectadas y no infectadas de los nódulos.	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Organismos en los que han sido descritos transportadores específicos de molibdato	12
Tabla 2. Cepas de <i>S. meliloti</i>	22
Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i>	22
Tabla 4. Concentraciones de los reactivos empleados en el clonaje de secuencias	33
Tabla 5. Condiciones estándar de PCR utilizadas para la polimerasa Phusion.	33
Tabla 6. Concentraciones de los reactivos usados para la PCR.	34
Tabla 7. Condiciones de PCR usadas para las polimerasas Dream Taq y BIOTOOLS	34
Tabla 8. Condiciones estándar de qRT-PCR empleadas.	35
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados.	36
Tabla 10. Vectores empleados para la clonación	38
Tabla 11. Reacciones de recombinación Gateway	39
Tabla 12. Anticuerpos secundarios empleados	46
Tabla 13. Secuencias de proteínas empleadas	53
Tabla 14. Genes MOT1 en <i>M. truncatula</i>	60
Tabla 15. Número de genes que codifican miembros de la familia MOT1 en plantas leguminosas y no leguminosas.	61

ABREVIATURAS

ABC	Del inglés “ <i>ATP binding cassette</i> ”
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
bp	Pares de bases
BSA	Del inglés “ <i>Bovine serum albumin</i> ”
bv	Biovar
CDS	Secuencia codificante del inglés “ <i>Coding Sequence</i> ”
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
DAPI	Del inglés “ <i>4',6-diamidino-2-phenylindol</i> ”
DMA	Ácido desoximugineico; del inglés “ <i>DeoxyMugineic Acid</i> ”
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dNTPs	Del inglés “ <i>deoxynucleotide triphosphates</i> ”
dpi	Días post-inoculación.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Del inglés “ <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ”
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> ”
Gm	Gentamicina
His	Histidina
HMA	Del inglés “ <i>Heavy Metal P-type ATPase</i> ”
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
IRT	Del inglés “ <i>Iron Regulated Transporter</i> ”
Km	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LysM	Del inglés “ <i>Lysin Motif</i> ”
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> ”
MOT	Del inglés “ <i>Molybdate transporter</i> ”
MTP	Del inglés “ <i>Metal Transporter Protein</i> ” véase también CDF
NA	Nicotianamina
Nod	Nódulo

Nramp	Del inglés “ <i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i> ”
OAA	Oxalacetato
DO	Densidad Óptica
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nm
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
p/v	Peso/Volumen
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real; del inglés “ <i>Quantitative Real Time PCR</i> ”
Rif	Rifampicina
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> ”
Str	Estreptomicina
SULTR	Del inglés “ <i>Sulfate Transporter</i> ”
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> ”
v/v	Volumen/Volumen
YMB	Del inglés “ <i>Yeast Mannitol Broth</i> ”
YPD	Del inglés “ <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> ”
ZIP	Del inglés “ <i>Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein</i> ”

RESUMEN

La fijación simbiótica de nitrógeno es una de las fuentes **más importante de nitrógeno asimilable** en los ecosistemas naturales. En una de sus formas mejor estudiadas, este proceso es llevado a cabo por la interacción establecida entre las leguminosas y bacterias diazotróficas del suelo conocidas como rizobios. Tiene lugar en unos nuevos órganos en las raíces de las plantas, los nódulos, que contienen las bacterias endosimbióticas. Estas bacterias son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio mediante la enzima nitrogenasa. Esta enzima tiene en su centro activo un cofactor único en la naturaleza que contiene hierro-molibdeno. Por tanto, la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas es un proceso dependiente de este metal. El molibdeno es proporcionado por la planta hospedadora que lo toma del suelo y debe cruzar varios compartimentos no conectados simplásticamente gracias a transportadores específicos de molibdeno. Hipotetizamos que miembros de la familia MOT1 participan en este transporte. En esta Tesis Doctoral hemos validado esta hipótesis al identificar a dos miembros de esta familia, MtMOT1.2 y MtMOT1.3, como responsables del suministro de molibdeno a los nódulos. MtMOT1.2 se localiza en la endodermis de los vasos de la raíz y los nódulos y MtMOT1.3 en las células infectadas y no infectadas de la zona de fijación del nódulo. Basándonos en su localización y en su perfil de expresión estos transportadores parecen jugar un papel relevante en la entrega de molibdeno a las bacterias fijadoras de nitrógeno del interior de los nódulos. La mutación de estos genes causa una reducción importante de la actividad nitrogenasa debido a que molibdeno no se incorpora a las células fijadoras de nitrógeno, careciendo la nitrogenasa de un cofactor esencial. El fenotipo de las líneas mutantes *mot1.2-1* y *mot1.3-1* se puede complementar añadiendo más molibdato a la solución de riego de estas plantas o mediante la transformación con una copia silvestre del gen mutado. Los resultados de esta tesis Doctoral indican que MtMOT1.2 está mediando el transporte de molibdato entre la raíz y los vasos y la liberación de molibdato al apoplasto del nódulo desde los vasos del mismo. La función de MtMOT1.3 parece ser facilitar la introducción de molibdato en las células infectadas y no infectadas del nódulo.

ABSTRACT

Symbiotic nitrogen fixation is one of the most important sources of assimilable nitrogen in natural ecosystems. This process is carried out by the interaction established between legumes and diazotrophic bacteria known as rhizobia. It takes place within the nodules, new root organs that contain the endosymbiotic bacteria. These bacteria are able to reduce atmospheric nitrogen to ammonia due to the enzyme nitrogenase. This enzyme contains the unique iron-molybdenum cofactor in its active centre. Consequently, the symbiotic nitrogen fixation in legume plants is dependent on molybdenum. This nutrient has to be provided by the host plant from the soil and delivered to nodule nitrogen-fixing cells crossing several symplastically disconnected compartments. We hypothesize that MOT1 family members participate in the molybdenum transport. In this PhD Thesis we have confirmed this hypothesis by identifying two MOT1 family members, MtMOT1.2 and MtMOT1.3, as responsible for molybdenum supply to nodules. MtMOT1.2 is localized in the endodermis of nodule and root vasculature, while MtMOT1.3 is localized in infected and non-infected cells in the nodule fixation zone. Based on their localization and expression profile, both of these genes seem to play a relevant role in the delivery of molybdenum to the nitrogen fixing bacteria within the nodules. Mutation of these genes result in a severe reduction of nitrogenase activity, likely the consequence of nitrogenase not being functional as the essential molybdenum cofactor is not taken up. The phenotype of the mutant lines *mot1.2-1* and *mot1.-3-1* could be complemented by the addition of more molybdate to the nutrient solution or by the transformation with a wild type copy of the mutated gene under its own promoter. The results of this PhD Thesis indicate that MtMOT1.2 is mediating the transport of molybdate between the root and the vasculature and the release of molybdate into the nodule apoplast from nodule vasculature. The function of MtMOT1.3 is to facilitate the introduction of molybdate into the nodule infected and non-infected cells.

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO PARA EL CRECIMIENTO VEGETAL

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los organismos ya que representa entre el 1-4% de las células, formando parte de proteínas y ácidos nucleicos, entre otras moléculas (Hirsch & Mauchline, 2015, Leghari et al., 2016). En el caso de las plantas se ha observado que un mayor aporte de este elemento favorece el crecimiento (Xin et al., 2014). Las plantas lo asimilan preferentemente en forma de amonio (NH_4^+) o de nitrato (NO_3^-), dependiendo de la forma mayoritaria presente en el suelo, lo que a su vez depende de la aireación y el pH del mismo y de las especies que crezcan en él (Maathuis, 2009). Aquellas plantas que colonizan suelos con un pH más bajo y encharcamiento tienden a asimilar preferentemente NH_4^+ , mientras que plantas de suelos más ácidos y aireados prefieren NO_3^- (Maathuis & Diatloff, 2013, Xuan et al., 2017). Además del N inorgánico las plantas también pueden adquirir N orgánico, en forma de aminoácidos, que son mucho menos móviles que las formas de N mencionadas anteriormente (Kielland, 1994). Sin embargo las plantas no pueden emplear directamente la mayor fuente de N presente en la naturaleza, el dinitrógeno (N_2), que representa el 78 % de la atmósfera (Xuan et al., 2017).

La agricultura moderna depende en gran medida del uso de fertilizantes nitrogenados para mantener los niveles actuales de producción (Ray et al., 2006, Ladha et al., 2005, Amanullah et al., 2016, Zhang et al., 2017). Se han llevado a cabo estimaciones de que en el año 2008 el 48% de la población mundial se alimentó de cultivos crecidos gracias a los estos fertilizantes (Erisman et al., 2008). Sin embargo su uso intensivo conlleva una serie de consecuencias negativas. Uno de los principales problemas que presentan es la baja eficiencia de absorción de los mismos por parte de las plantas. Dependiendo del tipo de cultivo se estima que solo se llega a aprovechar entre el 30-65 % del N aplicado en forma exógena (Raun & Johnson, 1999, Kant et al., 2011). Del porcentaje de N no asimilado una parte se pierde por lixiviación, pudiendo contaminar aguas subterráneas y otros sistemas acuáticos, provocando procesos de eutrofización y acidificación (Raun & Johnson, 1999, Kant et al., 2011, Hirsch & Mauchline, 2015). Otra parte del N vuelve a la atmósfera en forma de N_2 por procesos de nitrificación llevados a cabo por microorganismos del suelo, o bien como consecuencia de procesos de dinitrificación, en forma de óxido nítrico (N_2O), uno de los principales gases de efecto invernadero (Wood & Cowie, 2004). Además, gran parte de los fertilizantes nitrogenados inorgánicos que se emplean en agricultura se producen mediante el proceso industrial de Haber-Bosch, el cual tiene un coste económico muy alto, representando el 1,2 % del consumo total de energía a nivel mundial (International Fertilizer Association: <https://www.fertilizer.org/>). Por estas razones es necesaria la optimización de los sistemas de cultivos y la reducción del uso de fertilizantes nitrogenados, mediante técnicas agronómicas o biotecnológicas.

Además de la fijación industrial del N_2 mediante el proceso de Haber-Bosch que se ha mencionado anteriormente, en la naturaleza también se producen procesos de fijación de N_2 . Estos pueden ocurrir de manera abiótica, como consecuencia de descargas eléctricas durante las tormentas (Noxon, 1976, Hill et al., 1980), o de manera biótica, llevada a cabo por eubacterias y arqueas, lo que se conoce como fijación biológica de N. Este proceso aporta la mayoría del nitrógeno de origen no antropogénico al ciclo del N (Benemann & Valentine, 1972) y puede ser llevado a cabo por bacterias en vida libre, como *Azotobacter* (Strandberg & Wilson, 1968) o las cianobacterias (Fay, 1992); o bien por bacterias que establecen una relación de simbiosis con otros organismos eucariotas: protistas, hongos, plantas y animales, lo que se conoce como fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) (Kneip et al., 2007). Dentro la FSN una de las asociaciones mejor descritas y más relevantes a nivel agronómico es la que se establece entre ciertas bacterias del suelo, denominadas rizobios, y las leguminosas (Garg & Renseigné, 2007). Los rizobios son en su mayoría α -proteobacterias como las pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, entre otros (MacLean et al., 2007). Más recientemente se han descrito β -proteobacterias, como las pertenecientes al género *Burkholderia*, que son capaces de establecer relaciones de simbiosis con leguminosas tropicales (Chen et al., 2003). Por su parte, se conocen unas 12.000 especies de leguminosas capaces de establecer simbiosis con rizobios (Maróti & Kondorosi, 2014). Se trata de un conjunto de especies vegetales de gran relevancia agronómica, ya que se emplean tanto para la alimentación humana (soja, lentejas, habas, etc) como en alimentación del ganado (alfalfa y trébol). Representan el segundo cultivo más importante con un 27% de la producción agrícola primaria, solo por detrás de los cereales, y además contribuyen aportando el 33 % del N necesario en la dieta humana (Graham & Vance, 2003, Zhu et al., 2005). Su importancia llevó a que el 2016 fuese declarado por la *Food & Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) año internacional de las legumbres de grano. Asimismo, al ser empleadas en sistemas de rotación de cultivos con cereales permiten disminuir la cantidad de fertilizantes nitrogenados empleados, además de mejorar la salud y estructura del suelo (Fowler et al., 2013). De este modo una mejor comprensión de la FSN permitiría aumentar la producción agrícola en especies leguminosas con un menor impacto ambiental. Esta información también posibilitará la transferencia de esta capacidad a plantas no leguminosas (Oldroyd, 2013; Burén & Rubio, 2018).

2. ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA Y DESARROLLO DEL NÓDULO

El establecimiento de la simbiosis comienza con el intercambio de señales químicas entre la

leguminosa y el rizobio. Las raíces de la planta exudan compuestos fenólicos, flavonoides e isoflavonoides, que son reconocidos como señales de quimiotaxis por los rizobios mediante receptores de membrana plasmática. Ante la presencia de un compuesto exudado por una leguminosa compatible, el rizobio activa la transcripción de los genes *nod* que producen los factores Nod (Brewin, 1991). Estos factores son lipoquitooligosacáridos, cuya especificidad viene determinada por la longitud de la cola de quitooligosacáridos y las sustituciones en los extremos de la molécula (Dénarié et al., 1992). La planta detecta los factores Nod gracias a receptores de membrana con actividad quinasa y con dominios extracelulares LysM, semejantes a los implicados en el reconocimiento de patógenos (Radutoiu et al., 2003). Los dominios quinasa desencadenan una cascada de señales que provocan oscilaciones de calcio en el núcleo y el citoplasma de las células de la epidermis y el córtex de la raíz (Zipfel & Oldroyd, 2017). Como consecuencia se produce la reorganización del citoesqueleto de las células de la epidermis y el crecimiento del pelo radicular alrededor de los rizobios, (Brewin et al., 2004). Seguidamente se invagina la pared y membrana de la célula del pelo radicular, formándose un conducto estrecho y tubular, denominado canal de infección. A través de este canal las bacterias comienzan a propagarse de célula a célula y a progresar por multiplicación hasta alcanzar las células del córtex de la raíz. Allí, mediante un proceso similar a la endocitosis se liberan los rizobios al citosol. Así se forma un pseudo-orgánulo, el simbiosoma formado por los rizobios diferenciados a bacteroides rodeados por una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidal o del simbiosoma (Brewin, 1991, Maróti & Kondorosi, 2014). Simultáneamente a la colonización por los rizobios, las células del córtex y el periciclo de la raíz van a proliferar desarrollando unos nuevos órganos denominados nódulos, en cuyo interior se produce la FSN. Los bacteroides exportan a la planta el nitrógeno en forma de amonio principalmente (White et al., 2007, Udvardi & Poole, 2013) y a cambio las bacterias obtienen de la planta la energía y los metabolitos necesarios para realizar la fijación de nitrógeno (Udvardi & Poole, 2013).

En función de la especie de leguminosa, se pueden desarrollar dos tipos diferentes de nódulos, que presentan crecimiento determinado o indeterminado. Los nódulos determinados, característicos de especies como *Lotus japonicus*, *Glycine max* o *Phaseolus vulgaris*, son redondeados, pierden su meristemo en etapas tempranas del desarrollo y contienen una población homogénea de células simbióticas. Por el contrario, los nódulos indeterminados, característicos de especies como *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* o *Vicia hirsuta*, presentan un meristemo en el ápice del nódulo que mantiene su actividad a lo largo de la vida del mismo. Esto determina una diferenciación espacial en zonas (Patriarca et al., 2004, Xiao et al., 2014, Roux et al., 2014, Maróti & Kondorosi, 2014). En un nódulo indeterminado maduro es posible distinguir 4 zonas: la zona I se corresponde con el meristemo del nódulo; la zona II o zona de infección, donde las bacterias colonizan las células vegetales a partir de los canales de infección y se diferencian a

bacteroides con capacidad de fijar nitrógeno; la zona III o zona de fijación, donde los bacteroides maduros fijan el nitrógeno; y la zona IV o zona de senescencia donde tras la muerte de las células se produce el reciclaje de nutrientes. Entre la zona II y la zona III es posible distinguir una región de entre 1 y 3 capas celulares más densas, denominada interzona, cuyas células presentan mayor cantidad de amiloplastos (Vasse et al., 1990). Estas zonas están rodeadas por tejidos estructurales que las separan del medio externo: la epidermis, el córtex y la endodermis (Figura 1A) (Guinel, 2009, Popp & Ott, 2011, Udvardi & Poole, 2013). En el interior de los nódulos se distinguen los haces vasculares, que, al contrario que los de la raíz, presentan una distribución periférica. Estos haces conectan directamente con la raíz y se extienden hasta la zona II del nódulo. Están compuestos por xilema y floema, situados en el interior del haz, rodeados por entre una y cinco capas de células del periciclo (Pate et al., 1969). Alrededor del periciclo se localiza la endodermis, que presenta, al igual que la endodermis de la raíz, la banda de Caspary, que impiden el flujo de sustancias por el apoplasto y los espacios intercelulares, forzando a dichas sustancias a entrar en el interior de las células y proporcionando un control sobre los metabolitos que pasan desde los vasos al interior del nódulo y viceversa (Figura 1B) (Pate et al., 1969, Guinel, 2009).

3. FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

Como se ha indicado en el apartado anterior, es en el interior de las células infectadas en la zona III de los nódulos donde los rizobios, diferenciados a bacteroides llevan a cabo la FSN. El complejo enzimático de la nitrogenasa cataliza la siguiente reacción (Seefeldt et al., 2009):

La estructura de este complejo está muy conservada y consta de dos componentes: El componente I (NifDK) es un tetrámero formado por cuatro subunidades: dos subunidades α , producto de la expresión del gen *nifD* y dos subunidades β , producto del gen *nifK*. El tetrámero $\alpha_2\beta_2$ tiene un peso molecular de entre 220-240 kDa y contiene dos metaloclusters de hierro-azufre: en la interfaz entre la subunidad α y la subunidad β se localiza el P-cluster [8Fe-7S] y en el interior de la subunidad α se localiza el cofactor de hierro-molibdeno (FeMoco) [Mo7Fe9SC] (Homocitrato). El componente II es un dímero formado por dos subunidades idénticas producto del gen *nifH*. Cada de las cuales tiene un peso molecular de 33 kDa y contiene un sitio de unión Mg-ATP y un clúster [4Fe-4S], localizado cerca de la interfaz con el componente I (Dos Santos et al., 2004, Hoffman et al., 2014, Rubio & Ludden, 2005, Seefeldt et al., 2009, Sickerman et al., 2017).

Figura 1. Estructura de un nódulo indeterminado A) Imagen de microscopía óptica y representación esquemática de un nódulo indeterminado de *M. truncatula*. Ci = célula infectada, Cni= célula no infectada, HV= haz vascular. En la imagen de microscopía óptica no puede apreciarse zona IV o de senescencia ya que el nódulo fue recogido a 28 dpi. B) Imágenes de un haz vascular de un nódulo indeterminado de *T. repens* adaptada de Pate et al. (1969). X = xilema, PH = floema, P = periciclo, E = endodermis, C = banda de Caspary

La unión entre los dos componentes de la nitrogenasa es dinámica, generándose una unión transitoria cada vez que comienza la hidrólisis de los ATP en el componente II. Los electrones liberados pasan desde el cluster [4Fe-4S] situado en la interfaz de los dos componentes hasta el P-clúster del componente I. De allí son transferidos al FeMoco, en donde deben acumularse 4 electrones para que se produzca el cambio conformacional que permite el acceso del N_2 al sitio activo. Para que se produzca la reducción N_2 a NH_3 deben acumularse otros cuatro electrones más, hasta alcanzar un total de ocho (Dos Santos et al., 2004, Rubio et al., 2004, Seefeldt et al., 2009, Hoffman et al., 2014). La nitrogenasa es capaz de reducir otros muchos sustratos, además del N_2 , de entre los cuales cabe destacar especialmente la reducción de acetileno a etileno. Esta reacción es empleada habitualmente para medir la actividad enzimática de este complejo enzimático, ya que el acetileno y etileno atraviesan las membranas celulares y pueden ser cuantificados empleando cromatografía de gases (Hardy et al., 1968, Halbleib & Ludden, 2000, Sickerman et al., 2017).

Figura 2. . Representación de la estructura tridimensional de la nitrogenasa y sus cofactores metálicos. Subunidad α del componente I en verde y subunidad β del componente I en rojo.

La FSN es un proceso energéticamente muy costoso, ya que la nitrogenasa necesita 16 ATP para reducir una molécula de N_2 , lo que implica que los bacteroides deben generar grandes cantidades de energía para sostener la reacción. Al tratarse de organismos aerobios estrictos, lo consiguen mediante una elevada tasa de respiración. Esto representa un problema puesto que la nitrogenasa sufre una inactivación irreversible al entrar en contacto con el oxígeno (Appleby, 1984), además de que la transcripción del gen *NifH* también se ve inhibida por este (Hennecke et al., 1985, Ditta et al., 1987). Para solventar esta problemática en los nódulos se producen varias adaptaciones que buscan generar un ambiente microaerobio entorno a los bacteroides.

Por una parte existen barreras físicas, que ayudan a generar un gradiente decreciente de oxígeno de la zona más externa del nódulo hacia el interior (Appleby, 1984). Por otra parte la proteína más abundante en los nódulos es la leghemoglobina, que además les confiere el color rosado característico. Esta proteína contiene un grupo prostético hemo con capacidad de unir oxígeno con una constante de asociación muy rápida y un ratio de disociación muy lento (Appleby, 1984, Billy et al., 1991, Ott et al., 2005). Gracias a estas estrategias la presión de oxígeno en la zona de fijación del nódulo está en torno a los 0,01 mmHg, lo suficientemente baja para permitir el funcionamiento de la nitrogenasa (Wittenberg, 1974). Para generar la alta tasa de respiración en los bacteroides con la presión de oxígeno tan baja estos emplean en su cadena de transporte de electrones una citocromo oxidasa de tipo *cbb3* que presenta una afinidad muy alta por el oxígeno. Esta enzima usa como cofactores hierro y cobre (Preisig et al., 1996a, Preisig et al., 1996b).

4. METALES EN LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

Los metales de transición como hierro, cobre, zinc o molibdeno son esenciales para el crecimiento vegetal ya que participan en la mayoría de los procesos biológicos de las plantas (O'Hara, 2001, Pilon et al., 2006, Hänsch & Mendel, 2009, González-Guerrero et al., 2016, Castro et al., 2018). Sin embargo, las plantas se encuentran en numerosas ocasiones en suelos con una baja disponibilidad de metales, generalmente porque estos están en formas insolubles, unidos a distintas partículas del suelo (Grotz et al., 1998, Palmer & Guerinot, 2009). Para resolver este problema las plantas emplean diversas estrategias: por un lado algunas establecen asociaciones con microorganismos u hongos micorrícicos para solubilizar los metales o intentar abarcar mayor superficie de suelo (Philippot et al., 2013, González-Guerrero et al., 2016). Otras estrategias se basan en sintetizar sustancias quelantes con capacidad de unir los metales y facilitar así su absorción (Palmer & Guerinot, 2009, Alvarez-Fernández et al., 2014). Una tercera estrategia, consiste en emplear bombas de H^+ para provocar la acidificación del pH del suelo incrementando la solubilidad de los metales. (Palmer & Guerinot, 2009, González-Guerrero et al., 2016). Las leguminosas emplean estas estrategias para satisfacer una demanda de metales es todavía mayor que en otras especies vegetales, al contar con unos órganos sumideros extra, los nódulos, ya que como se ha expuesto en el apartado anterior, una parte importante de las proteínas implicadas en la FSN son metaloproteínas que se expresan a altos niveles y requieren con cofactores metálicos para realizar su función (Tang et al., 1990, Grewal, 2001). La adquisición de estos nutrientes es tan importante para las leguminosas que si no logran satisfacer esta demanda se limita el desarrollo de los nódulos y la FSN (Tang et al., 1992, Tang et al., 1991). Cuando el proceso de nodulación se produce, la planta se carga de metales,

para poder garantizar un aporte suficiente a los nódulos (Terry et al., 1991).

Una vez los metales se encuentran en una forma soluble y asimilable para las plantas deben ser captados del suelo e incorporados a la vasculatura para su distribución a las distintas partes de la planta. Este proceso está bien muy caracterizado en el caso del hierro. Este metal suele encontrarse en el suelo quelado en forma de Fe^{3+} , que es reducido a Fe^{2+} gracias a la acción de feroreductasas de la familia FRO (Curie & Briat, 2003, González-Guerrero et al., 2016). Después se incorpora a través de la raíz gracias a transportadores de la familia ZIP, como AtIRT1 (Eide et al., 1996) de *A. thaliana* y otros de la familia NRAMP, como OsNRAMP5 (Ishimaru et al., 2012). Una vez en el xilema, y debido al bajo pH de éste, el hierro asocia a citrato, y es en esta forma como se distribuye a los distintos órganos (Curie & Briat, 2003). En el caso de las leguminosas se pudo determinar, empleando S-XRF (*Synchrotron-based X-Ray Fluorescence*), que el hierro llega a los nódulos desde los vasos de la raíz, a través de los vasos del nódulo, que lo liberan en el apoplasto de la zona II del mismo (Rodríguez-Haas et al., 2013). Una vez allí es incorporado a las células fijadoras de nitrógeno gracias a transportadores de la familia NRAMP, como el descrito en la leguminosa modelo *M. truncatula*, MtNRAMP1 (Tejada-Jiménez et al., 2015). Una vez en el interior de las células infectadas el hierro debe cruzar la membrana del simbiosoma de origen vegetal. Como responsable de esta labor se ha propuesto a LjSEN1, un transportador de hierro descrito en *L. japonicus*, que se expresa en células infectadas. Aunque se desconoce su localización exacta es un candidato para mediar el transporte de hierro a través de la membrana del simbiosoma (Hakoyama et al., 2012). Una vez cruzada esta membrana el hierro se acumula en el espacio peribacteroidal (LeVier et al., 1996) y desde allí debe cruzar las dos membranas del bacteroide. En *B. japonicum* se ha descrito FeoAB, un transportador de Fe^{2+} , localizado en la membrana interna de la bacteria. Este se expresa tanto en simbiosis como en vida libre y resulta esencial para la formación de los nódulos y la FSN en la asociación *B. japonicum* – *G. max* (Sankari & O'Brian, 2016).

El proceso del transporte del cobre y el zinc están peor caracterizados que el del hierro. Para la asimilación del cobre también es necesaria la intervención de feroreductasas de la familia FRO que reducen el Cu^{2+} , la forma de cobre más habitual en los suelos, a Cu^+ . En *A. thaliana* AtFRO4 y AtFRO5 son que median este proceso y su función es especialmente relevante en condiciones de deficiencia de este metal (Bernal et al., 2012). El transporte a través de la raíz es llevado a cabo por transportadores de la familia COPT, que en *A. thaliana* tiene 6 miembros, de los cuales el primero en ser caracterizado fue AtCOPT1 (Kampfenkel et al., 1995, Sancenón et al., 2004). La transferencia al xilema estaría mediada por proteínas de la familia HMA, que son ATPasas de tipo P_{IB} , en *A. thaliana* ha sido caracterizada AtHMA5 como responsable de llevar a cabo este proceso (Andrés-Colás et al., 2006, Kobayashi & Nishizawa, 2012). Respecto

al transporte a larga distancia del cobre éste se encuentra complejoado con distintas moléculas al viajar en el xilema y el floema, entre ellas se encuentra la nicotianamina (NA), el ácido deoximugénico (DMA) y los aminoácidos histidina y prolina (Irtelli et al., 2009, Hoffmann et al., 2012, Ando et al., 2013). En cuanto al transporte del cobre a los nódulos se desconoce exactamente cómo se produce, aunque es posible hipotetizar que también sea liberado al apoplasto de la zona II desde los vasos del nódulo, al igual que ocurre con el hierro (Rodríguez-Haas et al., 2013). Recientemente ha sido descrito un transportador de la familia COPT en *M. truncatula*, MtCOPT1, que es específico de nódulo y está localizado en la membrana de células infectadas de la zona II del nódulo, en las cuales estaría mediando la entrada de cobre (Senovilla et al., 2018). Se desconoce qué transportadores median el paso del cobre hacia el interior de los bacteroides, a través de las membranas del simbiosoma y de la propia membrana del bacteroide. En el transporte de zinc parecen estar implicados, principalmente, transportadores de las familias ZIP y HMA (Sinclair & Krämer, 2012). En leguminosas se han publicado recientemente dos transportadores implicados en el transporte de zinc a los nódulos, MtZIP6 que está localizado en la membrana plasmática de las células infectadas y que sería responsable de la entrada de zinc a las mismas (Abreu et al., 2017) y MtMTP2, localizado en el retículo endoplasmático de las células del nódulo (León-Mediavilla et al., 2018). La mutación de estos dos transportadores afecta la FSN lo que confirma la relación del zinc con este proceso. En contraste a estos avances en nuestro conocimiento de la homeostasis de hierro, cobre y zinc en nódulos, mucho menos se conocía al inicio de esta Tesis Doctoral sobre los mecanismos de transporte de molibdeno al nódulo, a pesar del papel central que este elemento juega en la FSN.

5. TRANSPORTE DE MOLIBDENO

A pesar de ser el micronutriente del que menor cantidad necesitan las plantas (Hänsch & Mendel, 2009) el molibdeno tiene un papel esencial en el metabolismo vegetal y en el de muchos otros organismos. En la naturaleza hay descritas más de 50 enzimas (la mayoría de ellas en bacterias y arqueas) cuya actividad depende de la presencia de Mo en forma de un cofactor derivado de pterina (Mo-cofactor) en su centro activo (Schwarz et al., 2009) (Figura 3A). En plantas se han encontrado hasta ahora cinco enzimas que contienen Mo-cofactor: nitrato reductasa, aldehído oxidasa, sulfito oxidasa, xantina oxidasa, y componente reductor de amidoxima mitocondrial. La nitrato reductasa cataliza la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), el primer paso de la ruta de asimilación del nitrato. Es un homodímero de unos 200 kDa y de localización citoplasmática (Mendel & Hänsch, 2002, Campbell, 1999). La aldehído oxidasa es también una proteína citoplasmática, de unos 300 kDa de peso molecular. Está implicada en la biosíntesis de hormonas, en concreto es responsable de la conversión de aldehído abscísico en ácido abscísico (ABA) (Seo & Koshida, 2002) y también está implicado en la biosíntesis de auxinas al catalizar

la oxidación de acetaldehído-3-idolacético a ácido indolacético (IAA) (Koshiba et al., 1996). La sulfito oxidasa es una proteína de pequeño tamaño (43 kDa) que se localiza en los peroxisomas, en donde lleva a cabo la oxidación de sulfito (SO_3^{2-}) a sulfato (SO_4^{2-}). Está implicada en el metabolismo de los compuestos azufrados como los aminoácidos metionina y cisteína y en la detoxificación del exceso de sulfito (Hänsch et al., 2007). La xantina oxidasa es un homodímero de unos 300 kDa, implicado en el catabolismo de las purinas al llevar a cabo la oxidación de hipoxantina a xantina. Como consecuencia de esta reacción se generan aniones superóxido y peróxido de hidrógeno que intervienen en procesos de la planta como la senescencia o la muerte celular como respuesta a patógenos (Hesberg et al., 2004). El componente reductor de amidoxima mitocondrial cataliza la reducción de sustancias N-hidroxiladas, muchas de las cuales son análogos de bases nitrogenadas que actúan como mutágenos en células eucariotas (Chamizo-Ampudia et al., 2011). Además de para estas enzimas, las leguminosas también necesitan molibdeno para sintetizar el cofactor FeMoco de la nitrogenasa, que si bien es un gen bacteriano, recibe el molibdeno a través de la planta hospedadora (Udvardi & Poole, 2013). FeMoco es fundamental para la actividad de la enzima responsable de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas, la nitrogenasa, (Hernandez et al., 2009). Este cofactor comprende un centro inorgánico $\text{Fe}_6\text{-S}_9$ que coordina un átomo central de carbono al que se le unen un átomo de Fe y otro de Mo. Una molécula de homocitrato coordina el átomo de Mo a través de sus grupos C-2 hidroxilo y carboxilo para completar el cofactor (Rubio & Ludden, 2008, Čorić & Holland, 2016, Hu & Ribbe, 2013) (Figura 3 B).

Figura 3. Representación de las estructuras químicas de los cofactores de molibdeno. A) Cofactor de molibdeno (Moco) B) Cofactor de hierro-molibdeno (FeMoco).

Respecto a cómo el molibdeno es asimilado por las plantas cabe destacar que durante un tiempo se aceptó que el transporte de molibdato (MoO_4^{2-}), la forma biodisponible de molibdeno más común en el suelo, ocurría a través de transportadores de sulfato (MacLeod et al., 1997,

Alhendawi et al., 2005). Al igual que ocurre en bacterias, en plantas el molibdato puede ser transportado de manera inespecífica por transportadores de sulfato, puesto que ambos oxianiones presentan una carga, radio iónico y forma muy similares (Fitzpatrick et al., 2008, Tejada-Jiménez et al., 2018). Este es el caso del transportador de sulfato de alta de afinidad SHST1 de la leguminosa *Stylosanthes hamata* que media el transporte de molibdato de manera no específica a concentraciones nanomolares, inhibiéndose su actividad de transporte de sulfato en presencia de molibdato (Fitzpatrick et al., 2008).

Sin embargo en bacterias sí que se conocían transportadores específicos y de alta afinidad de molibdato, pertenecientes a la familia ABC (*ATP binding cassette*) (Maupin-Furlow et al., 1995). Estos sistemas están generalmente constituidos por una o dos proteínas de membrana que forman un conducto para el paso del sustrato, una o dos proteínas de unión de ATP que se encuentran localizadas en el lado citoplasmático de la membrana, y una proteína periplásmica de alta afinidad de unión al sustrato (Davidson & Chen, 2004). En *E. coli* el sistema de transporte de alta afinidad de molibdato está codificado por el operón *modABC*, que da lugar a: ModA, proteína periplásmica de unión de molibdato; ModB, que forma una permeasa transmembrana y ModC, la proteína citoplasmática que energiza el proceso mediante la hidrólisis de ATP. Este sistema de transporte de alta afinidad (K_m de 50 nM) se regula mediante la acción del represor ModE (Grunden & Shanmugam, 1997). Esta proteína ejerce su función represora cuando la proteína dimeriza mediante la unión de una molécula de MoO_4^{2-} , formándose el complejo $\text{ModE}_2\text{-Mo}$ que se une a la región promotora del operón *mod* impidiendo la unión de la ARN polimerasa (Self et al., 2001, Schwarz et al., 2009). Además del sistema de alta afinidad, en *E. coli* se ha encontrado un sistema de transporte de sulfato codificado por el operón *cysPUWAM*, que es capaz de transportar molibdato como alternativa al sistema de alta afinidad, y un tercer sistema de transporte que podría ser incorporar aniones de manera no específica y que transportaría molibdato con baja afinidad (Lee et al., 1990, Rosentel et al., 1995). En rizobios se han identificado homólogos de *modABC* en *S. meliloti* (Galibert et al., 2001), *M. loti* (Kaneko et al., 2000), *Rh. leguminosarum* (Cheng et al., 2016) y *B. japonicum* (Delgado et al., 2006). En estos dos últimos rizobios se ha llevado a cabo además la caracterización funcional de el transportador ModABC y se ha observado que se trata de un sistema de transporte de molibdato de alta afinidad, cuya transcripción se inhibe con la presencia de molibdato y se activa en condiciones de deficiencia el mismo (Delgado et al., 2006, Cheng et al., 2016). Las cepas mutantes en distintos componentes de *ModABC* podían incorporar molibdato si este se encontraba presente en el medio, lo que indicaría que, también en el caso de rizobios, el molibdato se incorpora vía transportadores de sulfato (Delgado et al., 2006, Cheng et al., 2016). En simbiosis con plantas de soja los mutantes de *B. japonicum* para *modA* y *modB* crecidos en deficiencia de molibdato mostraban una reducción de la actividad nitrogenasa del 40% mientras

que si a la deficiencia de molibdato se le añadía una suplementación de sulfato la reducción en la actividad nitrogenasa caía hasta el 60% (Delgado et al., 2006). A pesar de toda la información disponible sobre los transportadores tipo ABC en procariotas la búsqueda de sus homólogos en eucariotas fue infructuosa y a día de hoy no se conocen homólogos a estos en ningún organismo eucariota. Sin embargo, en eucariotas sí que existen transportadores específicos de molibdato. Los primeros fueron identificados en paralelo en el alga verde, *Chlamydomonas reinhardtii* y en la planta *A. thaliana* (Tabla 1) (Tejada-Jiménez et al., 2007, Tomatsu et al., 2007). Esta familia de transportadores que fue nombrada MOT1 (*Molybdate Transporter type 1*), pertenece a la superfamilia de transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Tejada-Jiménez et al., 2018) y está relacionada a nivel de secuencia con los transportadores de sulfato de la familia SULTR (Tejada-Jiménez et al. 2007). Miembros de la familia MOT1 están presentes en algas, plantas, hongos y bacterias, pero no en animales, y comparten dos dominios conservados: PXPVQPMKX(I/L)(A/G)AXA y FGXMPXCHG(S/A)GGLAXQ(Y/H)XFG(A/G)RXG, que probablemente están involucrados en su actividad de transporte (Tejada-Jimenez et al., 2007).

Tabla 1. Organismos en los que han sido descritos transportadores específicos de molibdato. n.i. = no identificado

Organismo	Transportador	K _m	Localización subcelular	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrMOT1	7 nM	n.i.	(Tejada-Jiménez et al., 2007)
	CrMOT2	550 nM	n.i.	(Tejada-Jimenez et al., 2011)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMOT1	20 nM	MP / Mit	(Tomatsu et al., 2007)
	AtMOT2	n.i.	Vac	(Gasber et al., 2011)
<i>Lotus japonicus</i>	LjMOT1	182 nM	n.i.	(Duan et al., 2017)
<i>Oryza sativa</i>	ASY (MOT2)	n.i.	MP	(Hibara et al., 2013)
<i>Homo sapiens</i>	HsMOT2	546 nM	n.i.	(Tejada-Jiménez et al., 2011)

CrMOT1 es el único miembro de la familia MOT1 que se encuentra en *C. reinhardtii*. Aunque se desconoce su estructura, las predicciones de su topología indican que presenta nueve dominios transmembrana. CrMOT1 media la toma de molibdato hacia el citosol de manera específica y con alta afinidad ($K_m = 7$ nM). La regulación de este transportador es independiente de la disponibilidad de molibdato en el medio, aunque sí depende de la presencia de nitrato. Tanto la transcripción como la actividad de este transportador se activan cuando se cultiva *C. reinhardtii* en un medio en el que la única fuente de nitrógeno es nitrato. En estas condiciones la

molibdoenzima nitrato reductasa es la encargada del aporte de nitrógeno mediante la reducción de nitrato a nitrito, el primer paso del proceso de asimilación del nitrato (Tejada-Jiménez et al., 2007). En *A. thaliana* se han descrito dos miembros de la familia MOT1: *AtMOT1* y *AtMOT2* (Gasber et al., 2011, Tomatsu et al., 2007). *AtMOT1* también se trata de un transportador alta afinidad, con una $K_m = 20$ nM, que, al contrario que *CrMOT1* está regulado por la disponibilidad de molibdato en el medio, reduciéndose su expresión con la ausencia de este elemento (Tomatsu et al., 2007). Aunque *AtMOT1* parece estar implicado en la absorción de molibdeno desde el suelo se han presentado evidencias contradictorias en la literatura respecto a su localización subcelular. En Tomatsu et al. (2007) fusionaron la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo N-terminal de *AtMOT1* y localizaron este transportador en la membrana plasmática de la célula y en un compartimento intracelular. Sin embargo, en Baxter et al. (2008) llevaron a cabo esta fusión en el extremo C-terminal de la proteína lo que dio lugar a una localización mitocondrial. Por el contrario en el otro miembro de la familia MOT1 identificado en *A. thaliana*, *AtMOT2* se observó una clara localización vacuolar. Este transportador, que se identificó debido a su gran similitud de secuencia con *AtMOT1*, parece actuar como un exportador de molibdato de este compartimento celular, lo que podría indicar que la vacuola es el principal reservorio de molibdato en células vegetales (Gasber et al., 2011). Recientemente se ha identificado un transportador perteneciente a la familia MOT1 en la leguminosa *Lotus japonicus*. *LjMOT1* es un transportador específico de molibdato, con una $K_m = 182$ nM. Este transportador se expresa en la epidermis y endodermis de la raíz y parece estar implicado en la toma de molibdato del suelo. Sin embargo, plantas mutantes en este gen no mostraban una disminución en la actividad nitrogenasa durante la FSN, lo que indica que este transportador no está implicado directamente en el transporte de molibdeno a los nódulos (Duan et al., 2017).

Además de los miembros de familia MOT1 hay otros transportadores que participan en el transporte de molibdato, en concreto el primer miembro de la familia MOT2 fue identificado en *C. reinhardtii* (Tejada-Jiménez et al. 2011). Estos transportadores también pertenecen a la superfamilia MFS, pero apenas presentan homología con los transportadores MOT1 conocidos, careciendo de los motivos conservados que se encuentran en los transportadores de esta familia. Existen miembros de la familia MOT2 en plantas y en animales, incluido humanos. *CrMOT2* es un transportador de molibdato de alta afinidad ($K_m = 550$ nM), que al contrario que *CrMOT1* se sobreexpresa en situaciones de deficiencia de molibdeno (Tejada-Jimenez et al., 2011). En arroz (*Oryza sativa*) ha sido identificado un homólogo a *CrMOT2*, nombrado *ASY* (*Abnormal shoot in youth*). Este transportador se localiza en la membrana plásmatica de células de distintos órganos de la planta y podría estar implicado en la generación de microgradientes de molibdeno necesarios para el desarrollo de la planta (Hibara et al., 2013). Además, datos de expresión heteróloga en levaduras sugieren que el miembro de la familia MOT2 en humanos (*HsMOT2*)

media el transporte de molibdato al interior celular, siendo la primera proteína que se relaciona con la homeostasis de Mo en animales y específicamente en humanos (Tejada-Jimenez et al., 2011).

OBJETIVOS

A pesar de que el molibdeno es un micronutriente esencial para la FSN al formar parte del centro activo de la nitrogenasa, no se conocen los mecanismos por los que las plantas median la entrega de Mo al simbiosoma. Hasta la fecha no se ha identificado ningún transportador relacionado con el transporte Mo en nódulos. Dado que las proteínas de la familia MOT1 son las únicas de las que se han demostrado actividad de transporte de Mo en plantas, entre ellas en leguminosas, los miembros de esta familia podrían ser buenos candidatos para mediar el transporte de Mo en leguminosas incluyendo el abastecimiento de este metal a las estructuras directamente implicadas en la fijación simbiótica de nitrógeno, los nódulos.

Para determinar la posible implicación de los genes de la familia MOT1 en la homeostasis de molibdeno en los nódulos de la leguminosa modelo *M. truncatula* se fijaron los siguientes objetivos:

1. Determinación del patrón de expresión de los transportadores de la familia MOT1 en *M. truncatula*.
2. Caracterización de la localización tisular y subcelular de los transportadores candidatos a desempeñar una función en el transporte de molibdeno al nódulo.
3. Evaluación del papel que estos transportadores juegan en la homeostasis de Mo en condiciones de fijación de nitrógeno o cuando se le aporta a las plantas nitrógeno fijado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1.1. *Medicago truncatula*

Se empleó el ecotipo R108 de *M. truncatula* como modelo de estudio. Las semillas se escarificaron con 95 % (v/v) H_2SO_4 durante 7,5 minutos, y se lavaron con agua 8 veces. Se esterilizaron con 25 mg/ml de NaClO durante 90 segundos, y se enjuagaron al menos 6 veces con agua estéril. Las semillas fueron embebidas en agua estéril durante 16 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente fueron depositadas en placas de 0,8 % agar en agua y se estratificaron en oscuridad a 4 °C durante 48 horas. Las semillas se germinaron durante 48 horas a 22 °C. Para propagar estas plantas se empleó turba:vermiculita (3:1) como sustrato, y se crecieron en invernadero, cuyas condiciones son 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Las plantas se regaron 3 veces por semana con agua. Para los experimentos realizados en condiciones simbióticas las plántulas pre-germinadas se transplantaron a macetas de perlita estéril. Fueron inoculadas con 2 ml de un cultivo saturado de *S. meliloti* 2011. El cultivo se creció previamente durante 16 horas a 28 °C en TY (composición en apartado 2.3.1). Una vez crecidos, se centrifugaron a 5000 x g y fueron resuspendidos en agua. Las plantas inoculadas se crecieron en invernadero con unas condiciones de 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Estas plantas se regaron 3 veces por semana con agua o solución Jenner (composición en apartado 2.1.2) en días alternos (Brito et al., 1994). Para el control de plantas sin inocular, se sustituyó el inóculo con *S. meliloti*, por riegos con 2 mM NH_4NO_3 o 2 mM de KNO_3 cada dos semanas.

1.2. *Nicotiana benthamiana*

Las pre-germinación de las semillas de *N. benthamiana* se llevó a cabo 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 (16 horas de fotoperiodo y una temperatura de 18-25 °C).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa de levadura usada fue 31019b (MATa *ura3 mep1Δ mep2Δ::LEU2 mep3Δ::KanMX2*) (Marini et al., 1997)1997. Las levaduras se crecieron en YPD (Sherman et al., 1981) o en el medio selectivo SD (Sherman et al., 1981) suplementados con 2 % de glucosa. Se incubaron durante 3-5 días a 28 °C. La composición de estos medios se detalla en apartado 2.2.

1.4. *Sinorhizobium meliloti*

Las cepas utilizadas se recogen en la Tabla 2. Estas se crecieron en TY o YMB (Vincent, 1970; Beringer, 1974) 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 2.3.1 y 2.3.2.

Tabla 2. Cepas de *S. meliloti*

Cepa	Plásmido	Resistencia (µg/ml)	Genotipo	Origen
<i>S. meliloti</i> 2011	-	Estreptomicina 200	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de SU47	(Lerouge et al., 1990)
<i>S. meliloti</i> 2011	pHC60	Estreptomicina 200 Tetraciclina 10	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S. meliloti</i> 2011	(Cheng & Walker, 1998)
<i>S. meliloti</i> 1021	pCMB13 DsRED	Estreptomicina 200 Espectinomycin a 75	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S. meliloti</i> 1021 Str21	(Meade et al., 1982)

1.5. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* empleadas se detallan en la Tabla 3. Se crecieron en LB, apartado 2.3.3 (Bertani, 1951) con los antibióticos necesarios según el tipo de plásmido a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Tabla 3. Cepas de *E. coli*

Cepa	Genotipo	Selección	Origen
DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-arg F</i>) U169 <i>rec A1 end A1</i> <i>hsd R17</i> (rK-, mK+) <i>pho A sup E44 λ- thi-1</i> <i>gyr A96 rel A1</i>	Interrupción de <i>lacZ</i> usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal).	(Hanahan, 1983)
DB3	F- <i>gyr A462 end A1</i> Δ(<i>sr1-rec A</i>) <i>mcr B mrr</i> <i>hsd S20</i> (rB-, mB-) <i>sup E44 ara-14</i> <i>gal K2 lac Y1 pro A2</i> <i>rps L20</i> (SmR) <i>xyl-5 λ-leu mtl 1</i> .	Resistencia a la toxicidad del gen <i>cddB</i>	(Bernard & Couturier, 1992)

1.6. *Agrobacterium rhizogenes*

La cepa *A. rhizogenes* ARqual empleada deriva de A4T (Boisson-Dernier et al., 2001). Su genotipo es pRiA4-Onc⁺ Str^R y fueron crecidas en LB (Bertani, 1951) (composición en apartado 2.3.3), con los antibióticos apropiados a 28 °C durante 48 horas.

1.7. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* C58C1 usada en este trabajo (Deblaere et al., 1985) se creció en LB (Bertani, 1951) (apartado 2.3.3), con los antibióticos apropiados y se incubó a 28 °C durante 48 horas.

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

2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIÓN DE RIEGO

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

2.1.1. Medio Fahraeus

Este medio (Dazzo, 1982) se empleó para el crecimiento *in vitro* de plántulas transformadas y para los ensayos de crecimiento en placa de plantas de *M. truncatula*.

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
 0,001 % (v/v) Mix micronutrientes
 2 % (p/v) Agar bacteriológico

La solución se ajustó 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 (Brito et al., 1994) se utilizó para regar las plantas de *M. truncatula* cultivadas en

perlita y crecidas en el invernadero.

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

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

La solución se ajustó a pH 6,7.

Mix de 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) $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 0,143 % (p/v) H_3BO_3 .

2.2. Medios para el cultivo de levaduras

2.2.1. YPD (Yeast-Extract-Peptone-Dextrose)

Este medio es un medio rico empleado 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

Se añadió 2 % de agar bacteriológico para su uso en medio sólido.

2.2.2. SD (Synthetic 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

Se añadió 2 % de agar bacteriológico para su uso en medio sólido.

2.3. Medios para el cultivo de bacterias

2.3.1. TY (Tryptone Yeast)

Este medio (Beringer, 1974) se utilizó como medio rico para el cultivo de cepas de *S. meliloti*.

0,6 % (p/v) Triptona

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

0,05 % (p/v) CaCl_2

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

2.3.2. YMB (Yeast Manitol Broth)

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

0,04 % (p/v) Extracto levadura

0,1 % (p/v) Manitol

0,01 % (p/v) K_2HPO_4

0,02 % (p/v) MgSO_4

0,01 % (p/v) NaCl

Se ajustó el pH del medio a 6,8.

2.3.3. LB (Lysogeny Broth)

El medio LB se utilizó para el crecimiento 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

Para la preparación del medio sólido se añadió un 2 % de agar bacteriológico.

2.3.4. SOC

Este 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 MgCl_2

10 mM MgSO_4

20 mM Glucosa

El pH se ajustó a 7.

2.3.5. SOB (Super Optimal Broth)

El medio SOB (Hanahan, 1983) se empleó para preparación de células competentes para ser transformadas por choque térmico.

- 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.

2.3.6. TB (Terrific Broth)

Este medio (Sambrook & Russell, 2006) se usó para la recuperación de células durante la obtención de células quimio-competentes.

- 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 NUCLEÍCOS

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

- i) Las plántulas fueron cultivadas durante 15 días en turba:vermiculita (3:1). Una vez que la plántula presentaba entre 2 y 3 hojas, se recogió una de ellas, y se congeló en nitrógeno líquido. Se homogeneizó en frío usando un pistilo de plástico.
- ii) A cada muestra se le añadieron 600 µl de tampón de extracción calentado previamente a 65 °C. El homogeneizado se incubó a 65 °C durante 20 min.
- iii) Tras añadir 600 µl de cloroformo se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min.
- iv) Se transfirió a un nuevo tubo la fase acuosa del sobrenadante resultante. En este nuevo tubo previamente se pusieron 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

v) Las muestras se centrifugaron a 15.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó con etanol al 70 % (enfriado previamente).

vi) Se realizó una centrifugación a 15.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. Se eliminó el etanol por completo empleando la pipeta y se evaporó por completo el mismo incubando los tubos a 37 °C durante 5 min.

vii) El sedimento se resuspendió en 40 µl de agua libre de DNAsas.

viii) Las muestras se congelaron a -20 °C para su almacenamiento.

ix) Para cada reacción de PCR se emplearon entre 10-50 ng (de 25 µl de volumen final).

Tampón de extracción: 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 2 % (p/v) CTAB; 1 % (p/v) NaHSO₃

3.2. Extracción de ADN genómico de plantas

Se empleó el kit DNeasy Plant Mini de Qiagen (Valencia, CA, EE.UU..) siguiendo este protocolo:

i) Se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido. Las muestras se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido. Una vez trituradas se añadieron 800 µl de tampón AP1 y 8 µl de RNAsaA directamente en el mortero.

ii) Las muestras se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se incubaron a 65 °C durante 10 min. Durante esta incubación se agitaron vigorosamente al menos 3 veces.

iii) Se añadieron 260 µl de tampón P3, se mezclaron las muestras por agitación y se incubaron 5 minutos en hielo.

iv) Se centrifugaron durante 5 minutos a 20.000 x g

v) El sobrenadante se pipeteó a una columna QIAshredder en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 2 minutos a 20.000 x g.

vi) El volumen recogido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo evitando alterar el sedimento. Se le añadieron 1,5 volúmenes de tampón AW1 y se mezcló todo por inversión.

vii) De esta mezcla se pipetearon 650 µl en una columna DNeasy Mini encajada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a 6.000 x g. El líquido resultante fue eliminado y se repitió este paso con la muestra restante.

viii) La columna se cambió a un nuevo tubo colector y se añadieron 500 µl de tampón AW2. Se centrifugó durante 1 minuto a 6.000 x g y se eliminó el líquido resultante.

- ix) Se añadieron otros 500 µl de tampón AW2 y se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 x g. La columna se transfirió a un nuevo tubo.
- x) La muestra se eluyó de la columna empleando 50 µl de agua MiliQ e incubándose durante 5 min. Se centrifugó 1 minuto a 6.000 x g.

3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Se tomaron 5 ml de un cultivo saturado de *E. coli* y se centrifugaron 1 minuto a 12.000 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento se empleó para la extracción del plásmido, empleando el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo este procedimiento:

- i) El sedimento se resuspendió en 250 µl de solución A1.
- ii) Se añadieron 250 µl de la solución de lisis A2, se mezclaron las muestras por inversión y se incubaron 5 min a temperatura ambiente.
- iii) Se añadieron 300 µl de solución de neutralización A, se mezclaron por inversión y se centrifugaron durante 10 minutos a 11.000 x g. Todo el volumen del sobrenadante se traspasó a una columna NucleoSpin Plasmid encajada en un tubo colector de 2 ml.
- iv) La columna se centrifugo 1 minuto a 11.000 x g y se descartó el liquido resultante retenido en el tubo colector.
- v) Se añadieron a la columna 600 µl de tampón A4 y se centrifugaron 1 minuto a 11.000 x g. El líquido resultante de la centrifugación se eliminó.
- vi) Durante 2 min se centrifugó la columna a 11.000 x g, para eliminar posibles restos de la solución A4.
- vii) La columna se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 30 µl de agua MiliQ para eluir el plásmido unido a la columna. Después se centrifugaron las columnas 1 minuto a 11.000 x g para recoger la muestra.

3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras

Transformantes de levaduras fueron crecidos durante 48 horas en 10 ml de medio SD suplementado con las auxotrofías requeridas. La obtención de ADN plasmídico se realizó de la siguiente manera:

- i) El cultivo se centrifugó a 12.000 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 500 ml de agua estéril para lavar las células.
- ii) Se transfirieron las células en suspensión a un tubo de 1,5 ml y se volvió a centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad. El sobrenadante se retiró.
- iii) El sedimento se resuspendió 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 mm de diámetro estériles.

iv) La mezcla se agitó vigorosamente mediante un vortex durante al menos 4 minutos y posteriormente se añadieron 0,2 ml de TE y se centrifugó por 5 minutos a 10.000 x g.

v) El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, se añadió 1 ml de isopropanol y se incubó 16 horas a temperatura ambiente.

vi) Tras la incubación se centrifugó 10 minutos a 10.000 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó con 70 % de etanol.

vii) Se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad, se desechó el sobrenadante y se dejó evaporar todo el etanol restante hasta que el sedimento quedó seco.

viii) El sedimento se resuspendió en 50 µl de agua MiliQ.

Tampón de extracción: 2 % Tritón X-100 (p/v); 1 % dodecilsulfato sódico (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

Las muestras vegetales empleadas para la extracción de ARN fueron siempre recogidas entre las 10-12 de la mañana para intentar minimizar el efecto de los ritmos circadianos.

En cada muestra se utilizó material de al menos tres plantas independientes que se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. El proceso empleado para la extracción de ARN fue el siguiente:

i) Las muestras congeladas se homogeneizaron en mortero empleando nitrógeno líquido. Luego se les añadió 1 ml de Tri-Reagent (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) directamente al mortero mezclándose bien.

ii) La mezcla se transfirió a un tubo de 1,5 ml (Mientras el resto de muestras eran procesadas las ya homogeneizadas se conservaron en hielo). Después todas las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.

iii) A cada muestra se le adicionaron 100 µl de cloroformo y se mezclaron por inversión, incubándose después 3 minutos a temperatura ambiente.

iv) Se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos a 10.000 x g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se le añadió 1 µl de glicógeno (concentración final 35 µg/µl) y 500 µl de isopropanol.

v) Las muestras se dejaron precipitar a -20 °C durante 16 horas.

vi) Se centrifugaron las muestras a 4 °C durante 10 min a 10.000 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó con etanol 75 % (v/v) frío.

- vii) Se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 7.500 x g. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente hasta eliminar todos los restos de etanol.
- viii) El sedimento se resuspendió empleando 40 µl de agua libre de RNAsas y se incubó a 60 °C durante 5 minutos.
- ix) Las muestras fueron tratadas con DNAsa para eliminar el DNA presente y para ello se añadió en cada muestra: 2,5 µl de DNAsa Turbo™ Ambion[®] (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), 5 µl del Buffer de la DNAsa Turbo y 2,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.
- x) Para limpiar el ARN se empleó el kit RNeasy Mini de Qiagen (Valencia, CA, EE.UU.)
- xi) El volumen de la muestra se ajustó a 100 µl con agua libre de RNAsa. Luego se añadieron 350 µl de solución RLT y 3,5 µl de β-mercaptoetanol.
- xii) Se añadieron 250 µl de etanol al 100 % y se mezcló por inversión transfiriéndose a una columna RNeasy Mini encajada en un tubo colector.
- xiii) Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 8.000 x g y el residuo se eliminó del tubo colector.
- xiv) Se añadieron a la columna 80 µl de DNAsa I en tampón RDD (10 µl DNAsa I por cada 70 µl de tampón RDD). Se incubaron las columnas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- xv) La inactivación de la DNAsa se llevó a cabo añadiendo 350 µl de solución RW1 y se centrifugaron las columnas 15 segundos a 8.000 x g. El residuo resultante se eliminó y este paso volvió a repetirse.
- xvi) Para el lavado de la columna se emplearon 500 µl de solución RPE y se centrifugó 1 minuto a 8.000 x g. Para incrementar el rendimiento este paso se repitió una vez más.

3.6. Cuantificación de ADN y ARN

El ADN y el ARN extraído se cuantificó mediante el Nanodrop ND-1000 UV/Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Se usó 1 µl de la extracción para medir la concentración. Para saber si las muestras estaban libres de la presencia de contaminantes como proteínas y/o fenol, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La relación entre ambas debía de ser superior a 1,8 para considerar la muestra libre de proteínas. Para evaluar la posible contaminación por carbohidratos, se usó la absorbancia obtenida de la relación entre 260 y 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 el

TBE. El tampón de carga empleado a 6X fue 0,25 % Orange G en 30 % glicerol. Para poder visualizar el ácido nucleico a la luz azul los geles se tiñeron previamente con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.).

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

3.8. Electroforesis desnaturalizante de ácidos nucleicos

El ARN se visualizó empleando geles de agarosa-MOPs (Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico). Los geles se prepararon con 1,2 % (p/v) de agarosa en el tampón MOPS al cual se le añadieron 2,5 ml de 37 % formaldehído (por cada 50 ml). Se cargaron 500 ng de ARN con el tampón de carga 2X. La electroforesis se realizó en tampón MOPS a un voltaje constante de 100 V durante 60 minutos. Las imágenes del gel fueron tomadas empleando el programa de análisis de imágenes Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.).

Tampón MOPS 10X: 200 mM MOPS pH 7; 50 mM Acetato Sódico; 10 mM EDTA disódico.

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

3.9. Recuperación de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron tras la carga de los productos de PCR en geles de agarosa. Las bandas obtenidas se cortaron del gel empleando un bisturí y se purificaron empleando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo este procedimiento:

- i) Para la elución de la agarosa se añadieron 200 μ l de solución NT1 por cada 100 mg de gel a un tubo donde previamente se había depositado el fragmento. Las muestras se calentaron a 50 °C entre 5-10 minutos, hasta la total disolución de la agarosa. Para facilitar el proceso los tubos se agitaron empleando el vórtex varias veces durante el tiempo de incubación.
- ii) Una vez disuelta toda la agarosa la muestra se traslado a una columna NucleoSpin Gel and PCR Clean-up encajada en un tubo colector y se centrifugó 30 segundos a 11.000 x g.
- iii) El líquido retenido en el tubo colector se desechó, y se lavó la columna añadiendo 700 μ l de solución NT3.
- iv) Se centrifugó la columna 30 segundos a 11.000 x g.
- v) Para la elución del DNA se añadió 30 μ l de agua MiliQ y se incubó la muestra 3

minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó la columna durante 1 minuto a 11.000 x g.

4. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Para este procedimiento se partió de 500 ng de ARN que fue tratado mediante el kit PrimeScript RT Reagent Kit (TAKARA, Kusatsu, Shiga, Japan) que consiste en:

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

A esta mezcla se añadieron también 0,5 µl de RNase OUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Esta reacción se incubó durante 15 minutos a 37 °C para que la enzima llevase a cabo la transcripción reversa. La enzima se inactivó incubando las muestras 5 segundos a 85 °C. Una vez sintetizado el ADNc, el ARN se eliminó incubando la muestra con 0,5 µl de Ribonuclease H (RNase H) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 30 minutos a 37 °C.

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

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

Este tipo de PCRs se emplearon para el clonaje de secuencias mediante la amplificación de un fragmento de ADN concreto o para la validación de la presencia de una determinada secuencia de ADN en una muestra. Como control positivo se emplearon 10-20 ng de ADN genómico y como control negativo una muestra sin ADN. Los oligonucleótidos empleados se detallan en el apartado 5.3. La visualización de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante geles de agarosa tal y como está explicado en el apartado 3.7. Se eluyeron las bandas de dichos geles para las clonaciones tal y como está descrito en el apartado 3.9.

5.1.1 PCR para el clonaje de fragmentos de ADN

Para la amplificación de los fragmentos de interés se empleó la polimerasa Phusion High-Fidelity

DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Esta enzima presenta una tasa de introducción de errores 50 veces menor a la de una polimerasa convencional. Los componentes empleados para la reacción y sus concentraciones aparecen detallados en la Tabla 4. Las condiciones de PCR usadas aparecen en la Tabla 5.

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos empleados en el clonaje de secuencias.

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

Tabla 5. Condiciones estándar de PCR utilizadas para la polimerasa Phusion

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Hibridación	55 °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

Estas PCR se utilizaron para el genotipado de mutantes a partir de ADN de planta, para la comprobación de la presencia de un fragmento clonado en bacteria (PCR de colonia), o para detectar la ausencia de amplificación en las extracciones de ARN. Se utilizaron dos tipos de polimerasas: la Taq Polimerasa de BIOTOOLS (Thermo, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y DreamTaq (Thermo, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). En la Tabla 6 aparecen detallados los componentes de la reacción y sus concentraciones y en la Tabla 7 están descritas las condiciones de PCR.

Para las PCR de colonia, en vez de utilizar ADN se empleó directamente la colonia bacteriana

recogiéndola con una punta de pipeta estéril. Primero se realizó una réplica en placa y a continuación se introdujo la punta en el tubo de PCR.

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos usados para la PCR

Componentes	Concentración final (25 µl) Dream Taq	Concentración final (25 µl) BIOTOOLS
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	0,75 U	1 U
DNA	5 pg-1 µg	10-100 ng

Tabla 7. Condiciones de PCR usadas para las polimerasas Dream Taq y BIOTOOLS

Nombre del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Hibridación	55 °C	30 segundos	35
Elongación	72 °C	60 segundos/Kb	
Elongación final	72 °C	7 minutos	1
Mantenimiento	12 °C	∞	1

Para genotipar las líneas segregantes de *M. truncatula* de la colección de mutantes del Noble Research Institute se empleó también este tipo de PCR. Las muestras se sometieron a tres tipos de PCR distintos para determinar si estas plantas eran heterocigotas u homocigotas para un gen concreto. Las PCRs empleadas fueron las siguientes:

- Específica del transposón: se realiza empleando dos oligonucleótidos específicos del transposón Tnt-1 (Tnt1-Fw y Tnt1-Rv)
- Transposón-Gen: se empleó un oligonucleótido específico del gen y otro específico del transposón. Si el transposón se ha insertado en sentido 5'→3', la combinación de cebadores sería Gen-Fw + Tnt1-Rv o Tnt1-Fw + Gen-Rv. Si el transposón se ha insertado en la orientación inversa a la fase de lectura, se usarán las combinaciones Gen-Fw + Tnt1-Fw, o Tnt1-Rv + Gen-Rv (Figura 4).
- Específica del gen: se emplearon oligonucleótidos específicos de cada uno de los

genes.

Figura 4. Esquema 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 estas PCRs, se emplearon 0,5 µl de una dilución 1:10 del ADNc (25 ng), los oligonucleótidos específicos del transcrito a amplificar (750 mM de cada uno) y 6 µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) hasta un volumen final de 10 µl por reacción. Se realizó un control negativo para cada par de oligonucleótidos sin añadir ADNc, para descartar posibles contaminaciones. El equipo usado para procesar las muestras fue StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con las condiciones de se recogen en la Tabla 8. La expresión del gen de estudio, se estandarizó junto con la del gen constitutivo *Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa (MtUb: Medtr4g077320)*. El calculo de los niveles de transcripción fue realizado siguiendo del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabla 8. Condiciones estándar de qRT-PCR empleadas

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
95 °C	10 minutos	1
95 °C	15 segundos	40
60 °C	1 minuto	Curva de desnaturalización
95 °C	15 segundos	
60 °C	1 minuto	
95 °C	15 segundos	

5.3. Oligonucleótidos

En la siguiente tabla (Tabla 9) se detallan los oligonucleótidos usados:

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia	Uso
5MtUBqF	GAACTTGTTGCATGGGTCTTGA	qRT-PCR para el gen de la <i>MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa</i>
3MtUBqR	CATTAAGTTTGACAAAGAGAAAGA GACAGA	qRT-PCR para el gen de la <i>MtUbiquitina carboxil-terminal hidrolasa</i>
5MtPI4K	GCAGATAGACACGCTGGA	qRT-PCR para el gen <i>MtPI4K (Medtr3g091400)</i>
3MtPI4K	AACTCTGGGCAGGCAATA	qRT-PCR para el gen <i>MtPI4K (Medtr3g091400)</i>
5MtPTB2	CGCCTTGTCAGCATTGATGTC	qRT-PCR para el gen <i>MtPTB2 (Medtr3g090960)</i>
3MtPTB2	TGAACCAGTGCCTGGAATCCT	qRT-PCR para el gen <i>MtPTB2 (Medtr3g090960)</i>
5MtUBC28	GGTTGATTGCTCTTCTCTCCCC	qRT-PCR para el gen <i>MtUBC28 (Medtr7g116940)</i>
3MtUBC28	GGTTGATTGCTCTTCTCTCCCC	qRT-PCR para el gen <i>MtUBC28 (Medtr7g116940)</i>
5MtMOT1.1+2087 QF	CCATTTGGAACCAGAAAAGTCCA	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.1</i>
3MtMOT1.1+2234 QR	GAACCCTAGCAAGACCTCACA	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.1</i>
5MtMOT1.2+1689 QF	GACCGAACTTTGCAGAAAGCA	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.2</i>
3MTMOT1.2+1813 QR	TGGGGATTGGCTTGTCATCA	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.2</i>
5MTMOT1.3+1077 QF	TTGTCATGGTGCCGGTGGAC	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.3</i>

5MTMOT1.3+1077 QF	TTGTCATGGTGCCGGTGGAC	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.3</i>
3MTMOT1.3+1237 QR	ACACTCCTAAGATCCCGACCGACC G	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.3</i>
5MTMOT1.4QF	CACACGACAACATCTCCAACGACC AACC	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.4</i>
3MTMOT1.4QR	AAGGTGTTGACTAGTGATAAGGC	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.4</i>
5MTMOT1.5+1260 QF	CTTGTGGGGTCTAGTGCTGC	qRT-PCR para el gen <i>MtMOT1.5</i>

6. CLONACIÓN

6.1. Vectores usados

Los vectores usados en este trabajo aparecen recogidos en la Tabla 10.

6.2. Clonación Gateway

Las secuencias que se clonaron 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 3.9. Posteriormente se clonaron por recombinación utilizando el sistema Gateway (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Para ello, se llevaron a cabo dos reacciones conocidas como reacción BP o reacción LR, en función de los sitios *att* flanqueantes empleados en el proceso de recombinación. En la reacción BP, un producto de PCR (con sitios *attB*), recombina con los sitios *attP* del plásmido de entrada pDONR207, mediante la acción de una Clonasa BP (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). La recombinación BP crea un clon de entrada con sitios *attL*. Este clon, en la segunda reacción LR, es capaz de transferirse mediante la Clonasa LR, a vectores de destino que presentan sitios *attR* (Tabla 11). Los vectores de destino empleados en este trabajo son tipo pGWB y se detallan en la Tabla 8. Cada reacción se incubó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Cada una de las clonaciones se transformaron en *E. coli* DH5 α .

6.3. Clonación por recombinación homóloga

Mediante este método de clonación es posible unir fragmentos de ADN sin necesidad de usar una ligasa. En su lugar se emplea el mecanismo natural de reparación de ADN de levaduras. Es necesario que el fragmento y el vector que vayan a ser ligados, compartan 40 pb de homología en sus extremos. Para lograrlo se linealiza el plásmido con una enzima de restricción y la secuencia homóloga de 40 pb que flanquea ambos lados del sitio de corte, que se añade a cada

uno de los cebadores para amplificar el inserto por PCR. Tras ser amplificado y purificado el inserto se transforma directamente en levaduras junto con el vector linealizado, donde se llevará a cabo el evento de recombinación homóloga entre el inserto y el plásmido. El ratio inserto:vector empleado en estas transformaciones fue de 7:1.

Tabla 10. Vectores empleados para la clonación

Tipo	Nombre	Selección bacteria	Selección planta/levadura	Características	Descrito en
Vector de entrada	pDONR207	Gm ^R	-	Vector de entrada	(Jefferson et al., 1987)
Vector binario	pGWB3	Km ^R	Km ^R	Sin promotor, fusionado gen <i>β-glucuronidasa</i>	(Nakagawa et al., 2007)
	pGWB5	Km ^R	Km ^R	Promotor 35S del “ <i>cauliflower mosaic virus</i> ”, fusión a GFP en C-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)
Vector de expresión en levaduras	pDR196	Amp ^R	Marcador seleccionable URA3	Promotor PMA1, marcador seleccionable lacZ, sin tag	(Rentsch et al., 1995)
Vector binario	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)

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 µl)	Clonasa LR (1 µl)
Agua	Hasta 5 µl	Hasta 5 µl

7. TRANSFORMACIÓN

7.1. Transformación de células de *E. coli*

7.1.1. Preparación de células quimiocompetentes

Para la generación de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes se empleó el siguiente procedimiento:

- Se inocularon 250 ml de SOB con 50 µl de un cultivo saturado de células DH5α.
- El cultivo se incubó a 18°C en agitación durante 48 horas hasta que alcanzó una DO₅₅₀ de 0,6-0,7 tras lo cual fue enfriado en hielo. Los pasos siguientes fueron todos realizados en frío.
- El cultivo se transfirió a unos tubos de centrifuga atemperados previamente en frío durante al menos 15 minutos.
- Se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 5.000 x g y se descartó el sobrenadante.
- El sedimento se resuspendió en 80 ml de TB y se incubó en hielo durante 10 minutos.
- Se centrifugaron las células a 4 °C durante 10 minutos a 5.000 x g y se descartó el sobrenadante.
- El sedimento se resuspendió en 20 ml de TB y se le añadió glicerol estéril a una concentración final de 20 % (v/v). Las células se incubaron durante 10 minutos en hielo.
- Se alicuotearon 400 µl de cultivo en tubos de 1,5 ml y se congelaron en nitrógeno líquido, conservándose a -80 °C hasta su utilización.

7.1.2. Transformación de células quimiocompetentes

- Cada alícuota de *E. coli* DH5α quimiocompetentes almacenadas a -80 °C se descongelaron lentamente en hielo.
- Se añadieron entre 10-150 ng de plásmido a 50 µl de células DH5α.

- iii) La mezcla se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 1 minuto. Inmediatamente después el tubo se incubó 2 minutos en hielo.
- iv) La recuperación de las células se llevó a cabo añadiendo 1 ml de SOC e incubando a 37°C durante al menos 1 hora.
- v) Las células se plaquearon en LB con los antibióticos requeridos en función del plásmido transformado.

7.1.3. Preparación de células electrocompetentes

Para generar células electrocompetentes de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Ausubel (1995).

- i) A partir de un cultivo saturado de *E. coli* se inoculó 1 litro de LB a una DO_{600} inicial de 0,02. El cultivo se dejó creciendo a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial.
- ii) Al alcanzar la DO_{600} de 0,6 las células se traspasaron a tubos estériles y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g.
- iii) El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió empleando 200 ml de agua estéril fría.
- iv) Se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g.
- v) El sobrenadante se descartó y las células se lavaron con 100 ml de agua estéril fría.
- vi) Se repitió a centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g.
- vii) Las células se lavaron con 50 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril y se centrifugaron otra vez a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g.
- viii) Las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol al 10 % (v/v) estéril y se alicuotearon 50 µl de células por tubo y se congelaron en nitrógeno líquido. Fueron conservadas a -80 °C hasta su posterior utilización.

7.1.4. Transformación de células electrocompetentes

Partiendo de las alícuotas de células electrocompetentes almacenadas a -80°C para su transformación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- i) Se descongelaron en hielo lentamente y se añadieron 10-50 ng de plásmido por cada alícuota de 50 µl de células.
- ii) La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo.
- iii) La electroporación se llevó a cabo 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.
- iv) La mezcla se transfirió a un tubo de 1,5 ml al cual se le añadió para recuperar las

células 1 ml de medio SOC.

v) Las células se incubaron a 37 °C al menos 3 horas.

vi) Se plaquearon en LB con los antibióticos correspondientes según el plásmido empleado.

7.2.Transformación de *Agrobacterium*

7.2.1. Preparación de células electrocompetentes

Para la generación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* C58C1 y de *A. rhizogenes* ARqua1 se siguió el procedimiento descrito en Wise et al. (2006).

i) Se preparó un inóculo de 5 ml de LB con los antibióticos necesarios para la cepa de *Agrobacterium* empleada y se dejó crecer en agitación a 28 °C durante 24 horas.

ii) Partiendo de este cultivo de 5 ml se inocularon 500 ml de LB suplementado con los antibióticos requeridos y se dejó crecer a 28 °C en agitación hasta que alcanzo una DO₅₅₀ de 0,5-0,8.

iii) Cuando el cultivo alcanzó esta DO se enfrió en hielo para la multiplicación celular. Todo el protocolo se debe realizar en frio y todas las soluciones e instrumental debe ser enfriado previamente.

iv) Se centrifugó el cultivo a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 10 ml de agua estéril. El volumen final se ajustó a 500 ml con agua estéril.

v) El paso anterior se repitió dos veces resuspendiendo las células el volúmenes casa vez menores: 250 ml y 50 ml.

vi) Las células se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g. Y se resuspendieron en glicerol al 10 % (v/v) estéril.

vii) Se elaboraron alícuotas de 50 µl en tubos de 1,5 ml y se congelaron en nitrógeno liquido para su almacenaje a -80 °C.

7.2.2.Transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*

La transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium* se llevó a cabo como está descrito en el apartado 7.1.4.

7.3. Transformación de células de *S. cerevisiae*

Se empleó el método del acetato de litio, descrito previamente por Gietz & Schiestl (1991).

- i) Se cultivó un inóculo de 5 ml de YPD durante 16 horas a 28 °C a partir de una única colonia crecida en YPD sólido durante 48 horas.
- ii) Partiendo de este cultivo saturado se inocularon 10 ml de YPD para que la DO_{600} inicial fuera de 0,1.
- iii) Se incubó el cultivo a 28 °C con agitación hasta que este alcanzó una DO_{600} de 0,4 (aproximadamente 4 horas, aunque el tiempo puede variar en función de la cepa de levadura empleada).
- iv) Se centrifugó el cultivo durante 5 minutos a 3.000 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución de litio estéril.
- v) Se volvieron a centrifugar las células durante 5 minutos a 3.000 x g. Al mismo tiempo se hirvió esperma de salmón (10 mg/ml) a 90 °C durante 10 minutos y después se mantuvo en hielo.
- vi) El sobrenadante fruto de la centrifugación se descartó y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución de litio estéril.
- vii) En cada 60 µl de células se añadieron 7 µl de esperma de salmón y entre 0,1-1 µg totales de ADN plasmídico de plásmido cerrado. Para la recombinación homóloga se le adicionó la amplificación de PCR y el vector con un ratio 7:1 (inserto:vector) o el plásmido cerrado. La mezcla se agitó mediante el vortex.
- viii) Se le añadieron 0,45 ml de PEG estéril y la mezcla volvió a agitarse en el vórtex.
- ix) Después la mezcla se incubó a 30 °C durante 30 minutos y se les dio un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos.
- x) 200 µl fueron plaqueados en SD suplementado con los aminoácidos requeridos en función de las auxotrofías de cada cepa.
- xi) Las placas se incubaron entre 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*

Se empleó *A. rhizogenes* ARqual para infectar plántulas de *M. truncatula* siguiendo el procedimiento descrito en Boisson-Dernier et al. (2001).

- i) Primero las semillas de *M. truncatula* fueron escarificadas y esterilizadas como se detalla en el apartado 1.1. Las semillas fueron germinadas durante 16-20 horas en

oscuridad.

- ii) Las radículas de las plantas germinadas no deben tener más de 1 cm de longitud. Se escindió el ápice radicular (aproximadamente 3 mm) mediante un bisturí estéril.
- iii) La raíz seccionada se arrastró sobre un césped de *A. rhizogenes* ARqua1 que contenía el plásmido de interés.
- iv) Las plántulas se transfirieron a placas de medio Fahraeus (Dazzo, 1982) a las cuales se les había añadido el antibiótico de selección en planta (ver Tabla 10) según el plásmido empleado.
- v) Las plantas transformadas se crecieron en una cámara de crecimiento *in vitro* a 22 °C y 16 horas de luz durante entre 21-28 días.
- vi) El criterio de selección de las plantas transformadas, transcurrido ese tiempo, es el crecimiento de raíces laterales en el medio Fahreaus suplementado con el antibiótico.

7.5. Agroinfiltración de *N. benthamiana*

Se empleó la infiltración de *A. tumefaciens* para la expresión transitoria en hojas *N. benthamiana*. Esta técnica suele ser conocida como “agroinfiltración” y se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Voinnet et al. (2003).

- i) Las células de *A. tumefaciens* C58C1 fueron transformadas siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 7.2 con las siguientes construcciones:
 - Plásmido (pGWB5 o pGWB6) que contiene el gen de *M. truncatula* que se desea expresar en tabaco (ADNc-pGWB5 o ADNc-PGWB6).
 - Plásmido (PM-CK pBIN) que contiene el marcador de membrana plasmática *AtPIP2*.
 - Plásmido (p19-pBIN6) que expresa p19 (supresor de silenciamiento génico).
- ii) Los *A. tumefaciens* C58C1 transformados con las construcciones de interés se crecieron en 5 ml de LB con los antibióticos adecuados a 28 °C durante 16 horas hasta que el cultivo alcanzó la saturación.
- iii) Se inocularon 500 µl de cultivo saturado en un matraz con 50 ml de LB con los antibióticos adecuados. Se incubaron estos cultivos a 28 °C durante 16 horas.
- iv) Los cultivos se centrifugaron durante 15 minutos a 5.000 x g, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en tampón de agroinfiltración hasta alcanzar una $DO_{600} = 1$.
- v) Las células resuspendidas se incubaron a temperatura ambiente entre 3 y 5 horas.
- vi) Justo antes de llevar a cabo la agroinfiltración se mezclaron los diferentes cultivos siguiendo estas combinaciones:
 - p19 + PM-CK pBIN (Control negativo)
 - p19 + PM-CK pBIN +ADNc-pGWB5

- p19 + PM-CK pBIN +ADNc-pGWB6

vii) Se infiltraron las plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de crecimiento con 20 ml de cada mezcla de cultivos.

viii) 48 horas tras la infiltración las hojas se escindieron en fragmentos de 0,5 cm y se observaron por microscopia confocal empleando un equipo Leica SP8 compuesto por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000. Las muestras se excitaron a 488 nm para la GFP (*Green Fluorescent Protein*) y a 458 nm para la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*). Se empleó transiluminación para distinguir el contorno de las células epidérmicas de las hojas. La visualización de las imágenes captadas se llevó a cabo mediante el software Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). El procesamiento de las imágenes captadas se llevó a cabo con 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).

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

Se recogieron tras 28 dpi plántulas de *M. truncatula* fueron transformadas con la fusión del promotor de interés al gen de la β-glucuronidasa (GUS) como aparece detallado en el apartado 7.4. Estas plántulas se trataron de acuerdo al protocolo detallado en Vernoud et al. (1999) con alguna modificación:

i) Las raíces y nódulos de las plantas se introdujeron en tubos con 40 ml de Solución GUS a los cuales previamente se les habían añadido 200 ml de X-GlcA (20 mg/ml). La mezcla se incubó durante 16 horas a 28 °C en oscuridad.

ii) Una vez transcurrido el tiempo la solución se retiró y las muestras se blanquearon empleando NaClO (25 mg/ml) durante 5 minutos. Después se realizaron 3 lavados con agua, tras los cuales las muestras se mantuvieron en agua para que conservaran la humedad.

iii) Las imágenes de los nódulos y raíces fueron tomadas con una lupa Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

iv) Tras tomar las imágenes de nódulos y raíces completas, ambos fueron incluidos en 6 % (p/v) de agarosa. Se realizaron secciones de 100 μm de grosor empleado un Vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EE.UU.).

v) Para observar las secciones se empleó 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-b-D-glucurónico. Se prepara a 20 mg/ml en dimetilformamida.

9. INMUNOLOCALIZACIÓN

Plantas de *M. truncatula* fueron transformadas con el plásmido pGWB13 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.4. Este vector fusiona la secuencia del gen que se desea expresar en planta, bajo el control de su propio promotor, a tres epítomos de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal. Las plantas transformadas fueron recogidas tras 28 dpi y los pasos seguidos fueron los siguientes:

i) Fijación, inclusión y corte de las muestras

- Las muestras se mantuvieron en Solución de Fijación a 4 °C durante 16 horas con agitación.
- Una vez transcurrido este tiempo la solución se retiró y las muestras se lavaron en PBS.
- Los nódulos se embebieron en 6 % (p/v) de agarosa en agua y se realizaron secciones de 100 µm de grosor empleando un Vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EE.UU.). Estas se depositaron en un portaobjetos de polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), sobre el cual se realizó la inmunohistoquímica.

ii) Inmunolocalización

- 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.
- 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.
- Se dio un tratamiento con celulasa (Onozuka)(SERVA, Heidelberg, Alemania) al 4 % (v/v) en PBS durante 1 hora, para permeabilizar las paredes celulares. Para inactivar la enzima se usó 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 15 minutos.
- Los cortes se lavaron con PBS durante 10 minutos y se bloquearon con 5 % (p/v) de BSA (albumina de suero bovino) (Merk, Darmstadt, Alemania) en PBS durante 30 minutos.
- Tras retirar la solución de bloqueo, la incubación de las muestras se llevó a cabo 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, EE.UU.).
- Las secciones se lavaron 3 veces con PBS, 15 minutos cada lavado.
- Se incubaron las muestras con una dilución 1:50 en PBS del anticuerpo secundario

detallados en la Tabla 12 durante 1 hora.

- Se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PBS.
 - Las secciones se incubaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1-5 µg/ml, concentración final) durante 15 minutos para teñir el ADN.
 - El exceso de DAPI se lavó con agua destilada por 5 minutos.
- Las muestras se conservaron en agua hasta su observación en microscopio confocal.

Tabla 12. Anticuerpos secundarios empleados

Fluoróforo conjugado	Anti	Producido en	Longitud de excitación	Longitud de emisión
Alexa 594	Anti-ratón	Conejo	561 nm	600-600 nm
Alexa 488	Anti-raton	Conejo	495 nm	500-550 nm

iii) Observación con microscopio confocal

Las muestras se observaron en un equipo confocal Leica SP8 integrado 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). La longitud de onda de excitación de las muestras según el tipo de anticuerpo secundario empleado aparece detallada en la Tabla 10. El GFP (verde) se excitó a 488 nm, el mCherry (rojo) se excitó a 587 nm y para excitar el DAPI (azul) se empleó UV. La fluorescencia emitida se recogió desde 500-550 nm para GFP, entre 600-610 para mCherry, entre 420-490 nm en el caso del DAPI y la de cada anticuerpo secundario empleado aparece detallada en la Tabla 12. Las imágenes captadas se montaron y procesaron usando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

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 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. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA

La actividad de la enzima nitrogenasa se determinó mediante el método de reducción de acetileno descrito por Hardy et al. (1968).

- i) Las raíces y los nódulos de entre 4-6 plantas seleccionadas al azar se introdujeron en

viales de 30 ml cerrados con tapones de goma.

ii) Se reemplazó un décimo del volumen de aire del vial (3 ml) por un volumen equivalente de acetileno.

iii) Las muestras se incubaron a temperatura ambiente 30 minutos.

iv) Una vez pasado ese tiempo se tomaron muestras de 0,5 ml por triplicado y se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-8 (Duisburg, Alemania), 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.

v) 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:

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

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

12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA

La actividad de la enzima nitrato reductasa se analizó siguiendo el procedimiento descrito en Scheible et al. (1997) con algunas modificaciones:

i) Como material de partida se emplearon 100 mg de tejido fresco de hojas de *M. truncatula*, que se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido y 1:6 de la Solución de Extracción (v/v).

ii) El homogenizado se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 14.000 x g.

iii) Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se añadieron a un tubo en el que previamente se habían añadido 500 µl de solución de reacción.

iv) Se incubó la mezcla a 30 °C durante 20 minutos.

v) La reacción se detuvo añadiendo 1 volumen de 1 % sulfanilamida (en 2,4 M HCl) y 1 volumen de 0,02 % N-1-naphtyl-ethylenediamine.

vi) La DO_{540} se midió con un espectrofotómetro de luz UV/visible Ultrospect 3300 pro (Amersham Bioscience).

Solución de extracción: 100 mM fosfato potásico pH 7,5, 5 mM acetato de magnesio, 10 % (v/v) glicerol, 10 % (p/v) polyvinylpolypyrrolidone, 0,1% (v/v) Triton-X100, 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) b-mercaptoetanol, 1 mM PMSF.

Solución de reacción: 50 mM fosfato potásico, 10 mM KNO₃, 5 mM EDTA, 0,5 mM NADH (Añadido justo en el momento de uso).

13. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas de nódulos y raíces de plantas de *M. truncatula* fue llevado a cabo como esta descrito en Larraínzar et al. (2007).

- i) Se partió de 100 mg de tejido fresco de nódulos o raíces de *M. truncatula*, que se homogeneizaron en un mortero empleando nitrógeno líquido.
- ii) El homogeneizado se resuspendió en solución de extracción de proteínas previamente enfriada
- iii) El homogenizado se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 5.000 x g.

Solución de extracción de proteínas: 25 mM MES, 450 mM mannitol, 7 mM EDTA, 7 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 20 mM ácido ascórbico 10 mM ditithreitol pH7,2.

13.1. Cuantificación de proteínas

El extracto proteico fue obtenido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 15. Para cuantificar la cantidad de proteína presente en el extracto se siguió el método descrito en (Bradford, 1976). Se cuantificaron entre 5-20 µl de extracto crudo de proteína a los cuales se añadió Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) hasta alcanzar un volumen de 1 ml. Se midió la OD₅₉₅ con un espectrofotómetro de luz UV/visible Ultrospect 3300 pro (Amersham Bioscience).

14. WESTERN BLOT

14.1. Electroforesis de proteínas y tinción del gel

Para desnaturalizar proteínas se hirvieron a 90 °C en tampón de carga Laemmli (Laemmli, 1970) durante 5 minutos. Se cargaron 25 µg de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) preparados con una zona de enfoque (4 % poliacrilamida) y una zona de separación (12 % acrilamida).

Tampón de carga Laemmli: 1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % (v/v) b-ercaptoetanol, 20 % (v/v) glicerol, 0,2 % (p/v) azul de bromofenol.

Gel condensador: 4 % (v/v) acrilamida-bisacrilamida solución 30 %, 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 1 % (v/v) dodecilsulfato sódico (SDS), 0,1 % (v/v) tetrametiletilendiamina (TEMED), 0,04 % (v/v) persulfato amónico (APS).

Gel separador: 12 % (v/v) acrilamida-bisacrilamida solución 30 %, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 1 % (v/v) dodecilsulfato sódico (SDS) 0,5 % (v/v) tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,04 % (v/v) persulfato amónico (APS).

La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema Mini-PROTEAN tetra vertical Electrophoresis Cell (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) empleando un tampón para electroforesis desnaturalizante. La electroforesis se realizó a 30 mA (amperaje constante) por gel durante 45-90 minutos.

Tampón de electroforesis desnaturalizante: 0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 0,1 % (p/v) SDS.

14.2. Eletrotransferencia de proteínas

Una vez separadas por SDS-PAGE las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m empleando el sistema Transfer-Blot® Semi Dry system (Bio-Rad) (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). El gel se incubó en Tampón de transferencia 10 minutos y se transfirió durante 45 min a 25 V (voltaje constante).

Para confirmar la presencia de proteínas se tiñó la membrana con rojo Ponceau durante 5 minutos. Luego la membrana se destiño usando agua destilada.

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

14.3. Inmunodetección de proteínas

El procedimiento seguido fue:

- i) La membrana de nitrocelulosa se incubó durante 5 minutos en Tampón 229.
- ii) Después se bloqueó en Tampón 229 con 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo durante 20 minutos con agitación.
- iii) Se incubó con el anticuerpo primario, en este caso un anticuerpo monoclonal anti-HA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) a concentración 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4 °C con agitación.
- iv) La membrana se lavó con Tampón 229 con 0,05 % (v/v) de Tween 20 durante 5 minutos en agitación. El lavado se repitió otras 2 veces.
- v) La membrana se lavó con Tampón 229 durante 5 minutos con agitación para eliminar

los restos de Tween 20.

vi) Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, en este caso un anticuerpo monoclonal anti-ratón producido en conejo y conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se usó en concentración 1:1000 y la incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación.

vii) Los lavados de la membrana se realizaron con Tampón 229 con 0,05 % (v/v) de Tween 20 durante 5 minutos en agitación y se repitieron 2 veces.

viii) Por último la membrana se aclaró con Tampón 229 durante 5 minutos con agitación para eliminar los restos de Tween 20.

ix) La detección se llevó a cabo empleando el sustrato ECL para el revelado de Western Blott (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Tampón 229: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl

15. INCLUSIÓN DE NÓDULOS LR-WHITE PARA ANÁLISIS DE ESTRUCTURA

Este protocolo fue desarrollado en el laboratorio de la Dr. Mercedes Lucas (ICA, CSIC, Madrid):

i) Nódulos de 28 dpi fueron fijados en una solución con 0,25 % (v/v) glutaraldehído, 4% (v/v) formaldehído, 2,5% (p/v) sacarosa en 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 durante 2 horas a 4 °C.

ii) Transcurrido ese tiempo se renovó el fijador y se incubó 1 hora y 30 minutos más a 4 °C.

iii) Se realizaron 3 lavados con 50 mM Tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5% sacarosa de 30 minutos a 4 °C.

iv) Los nódulos se deshidrataron usando series crecientes de etanol al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (v/v) en 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5 % sacarosa durante 10 minutos a 4 °C.

v) Luego se empleó 96 % (v/v) etanol en 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5 % sacarosa durante 30 min a 4 °C.

vi) Para el último paso de deshidratación se incubaron los nódulos en 100 % etanol durante 1 hora a 4 °C.

vii) Durante 3 horas se mantuvieron los nódulos en una mezcla 1:3 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación.

viii) Los nódulos se trasladaron a una mezcla 1:1 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación durante 16 horas.

ix) Después los nódulos se incubaron en una mezcla 3:1 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación por 3 horas.

- x) Las muestras se mantuvieron en Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) durante 24 horas a 4 °C con agitación.
- xi) Los nódulos se cargaron en cápsulas de gelatina rellenas con Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y se polimerizaron a 60 °C durante 24 horas.
- xii) Se realizaron secciones de 0,5 mm utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut (Leica, Viena, Austria) en el Centro Nacional de Microscopia Electrónica (Universidad Complutense de Madrid, España).
- xiii) Las secciones se tiñeron con 1 % azul de toluidina y se observaron con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes se tomaron con una cámara digital acoplada al microscopio Leica DFC 420C, Heerburgg, Switzerland).

16. INMUNOLocalización en Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)

16.1. Inclusión de nódulos en LR-White

Este protocolo fue desarrollado por el laboratorio de la Dr. Mercedes Lucas (ICA, CSIC, Madrid). Para este procedimiento se emplearon plántulas de *M. truncatula* transformadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.4 empleando el plásmido pGWB13. Este vector fusiona el gen de interés bajo el control de su promotor endógeno a tres epítopos HA en el extremo C-terminal.

- i) Nódulos de 28 dpi fueron fijados en una solución con 0,25 % (v/v) glutaraldehído, 4 % (v/v) formaldehído, 2,5 % (p/v) sacarosa en 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 durante 2 horas a 4 °C
- ii) El fijador se renovó y los nódulos se mantuvieron a 4 °C durante 1,5 horas.
- iii) Se lavaron las muestras con 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5 % sacarosa durante 30 minutos a 4 °C. Este lavado se repitió dos veces.
- iv) Los nódulos se deshidrataron usando series crecientes de etanol al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (v/v) en 50 mM Tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5 % sacarosa durante 10 minutos a 4 °C.
- v) Se mantuvieron en 96 % (v/v) etanol en 50 mM tampón de fosfato potásico pH 7,4 con 2,5 % sacarosa durante 30 min a 4 °C.
- vi) En el último paso de deshidratación se incubaron los nódulos en 100 % etanol durante 1 hora a 4 °C.
- vii) Durante 3 horas se mantuvieron los nódulos en una mezcla 1:3 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación.

- viii) Los nódulos se trasladaron a una mezcla 1:1 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación durante 16 horas.
- ix) Después los nódulos se incubaron en una mezcla 3:1 de Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y 100 % etanol a 4 °C con agitación por 3 horas.
- x) Las muestras se mantuvieron en Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) durante 24 horas a 4 °C con agitación.
- xi) Los nódulos se cargaron en cápsulas de gelatina rellenas con Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) y se polimerizaron a 60 °C durante 24 horas.
- xii) Se realizaron secciones de 1 mm utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut (Leica, Viena, Austria) en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Universidad Complutense de Madrid, España).
- xiii) Las muestras fueron colocadas en rejillas de cobre específicas para MET.

16.2. Inmunodetección de muestras para MET

- i) Las muestras, situadas sobre las rejillas de cobre, se bloquearon con una solución de 2 % BSA en PBS durante 30 minutos.
- ii) El anticuerpo primario usado fue anticuerpo monoclonal anti-HA producido en conejo (Sigma). Se empleó a una concentración 1:20 en PBS y se incubaron las rejillas durante 3 horas a temperatura ambiente.
- iii) Se realizaron 10 lavados de 2 minutos con PBS.
- iv) Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti-conejo conjugado a partículas de oro de 15 nm. Se empleó a concentración 1:50 en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
- v) Se lavaron las muestras 15 veces durante 2 minutos con PBS.
- vi) Se realizaron 10 lavados de 2 minutos con agua.
- vii) Las secciones fueron teñidas con 2 % de uracil acetato en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Universidad Complutense de Madrid, España).
- viii) Las imágenes fueron tomadas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Universidad Complutense de Madrid, España) empleando un microscopio electrónico JEM 1400 a 80 kV.

17. BIOINFORMATICA

17.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Para identificar los transportadores de metales empleados en este estudio se realizaron búsquedas tipo BLASTN y BLASTX en *M. truncatula* Genome Project site (<http://www.jcvi.org/medicago/index.php>). Para obtener las secuencias de proteínas homólogas de otros organismos se emplearon las bases de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>) y NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Las secuencias se alinearon empleando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y los árboles filogenéticos se realizaron mediante MEGA7, usando el algoritmo Neighbour Joining. Para la visualización y edición de los árboles se empleó FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Todas las secuencias usadas en este trabajo aparecen detalladas en la siguiente tabla:

Tabla 13. Secuencias de proteínas empleadas

Nombre	Organismo	Número de Acceso
AtMOT1	<i>A. thaliana</i>	NP_180139.1
AtMOT1.2		NP_178147.1
AtSULTR1.1		NP_192602.1
AtSULTR2.1		NP_196580.1
AtSULTR3.1		ANM64117.1
AtSULTR4.1		AED91910.1
BnMOT1.1	<i>Brassica napus</i>	XP_013709878.1
BnMOT1.3		XP_013667816.1
BnSULTR1.1		XP_013715602.1
BnSULTR2.1		NP_001302517.1
BnSULTR3.1		XP_013737126.1
BnSULTR4.1		XP_013667920.1
GmMOT1.1	<i>G. max</i>	XP_003545516.1
GmMOT1.4		KRH05029.1
GmMOT1.6		XP_003527804.1
GmMOT1.7		XP_003523708.1
GmSULTR1.3		XP_006593569.1
GmSULTR2.1		XP_003531538.1
GmSULTR3.1		XP_003521258.1
GmSULTR4.2		XP_003552670.1

LjMOT1.1	<i>L. japonicus</i>	AFK43331.1
LjMOT1.2		AJE26312.1
LjSST1		CAL36108.1
MtMOT1.1	<i>M. truncatula</i>	XP_013465770.1
MtMOT1.2		XP_013465776.1
MtMOT1.3		XP_013460259.1
MtMOT1.4		XP_013454709.1
MtMOT1.5		XP_003603486.1
MtSULTR1.1		XP_003614968.1
MtSAT1		XP_003602002.1
OsMOT1.1	<i>Oryza sativa</i>	XP_015650610.1
OsMOT1.2		XP_015621613.1
OsSULTR1.2		XP_015650733.1
OsSULTR2.1		ABF94445.1

17.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron con las siguientes herramientas bioinformáticas:

i) Descarga de secuencias

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

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

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

ii) 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/>)

Benchling (<https://benchling.com/editor>)

iii) 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>)

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

Las expresiones relativas de los genes analizados en esta tesis se obtuvieron de la base de datos Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>) (Roux et al., 2014). Estos datos se generaron a partir de ARN extraído mediante microdissección por laser de distintas zonas de los nódulos de *M. truncatula*.

RESULTADOS

1. TRANSPORTADORES DE MOLIBDENO EN *M. TRUNCATULA*

Con el fin de conocer cuántos miembros de la familia MOT1 existen en *M. truncatula* se analizó su genoma (<http://www.medicagogenome.org/home>), comparándolo con secuencias de proteínas MOT1 ya descritas. De esta forma, se encontraron 5 posibles miembros de la familia MOT1 (codificados por los genes *Medtr1g010210*, *Medtr1g010270*, *Medtr3g464210*, *Medtr4g011600* y *Medtr3g108190*) que comparten una identidad de entre el 51,4 % y el 65,7 % con el transportador de molibdato de *A. thaliana* AtMOT1. Dichas proteínas estaban anotadas como posibles transportadores de sulfato, sin embargo, la comparación de su secuencia con transportadores de sulfato (familia SULTR) y con transportadores de molibdato (familia MOT1) mostró una mayor relación con estos últimos (Figura 5 A).

A

B

Motivos conservados MOT1		P	P	V	Q	P	M	K	X	I	A	A	-	A	F	Q	-	M	P	-	C	H	G	A	G	G	L	A	-	Q	Y	-	F	G	G	R	-	G				
MtMOT1.1	97	P	M	P	V	Q	P	M	K	S	I	A	A	A	A	110	350	F	G	A	V	P	T	C	H	G	A	G	G	L	A	G	Q	Y	K	F	G	G	R	S	G	373
MtMOT1.2	93	P	M	P	V	Q	P	M	K	S	I	S	A	E	A	108	334	F	G	A	M	P	S	C	H	G	A	G	G	L	A	G	Q	Y	K	F	G	G	R	S	G	357
MtMOT1.3	101	P	M	P	V	Q	P	M	K	S	I	A	A	S	A	114	354	F	G	C	V	P	T	C	H	G	A	G	G	L	A	G	Q	Y	K	F	G	G	R	S	G	377
MtMOT1.4	85	P	M	P	V	Q	P	M	K	S	I	A	A	V	A	93	337	F	G	A	M	P	C	C	H	G	A	G	G	L	A	G	Q	Y	R	F	G	G	R	S	G	360
MtMOT1.5	82	P	M	P	V	Q	P	M	K	S	I	A	A	V	A	95	330	F	G	A	M	P	C	C	H	G	A	G	G	L	A	G	Q	Y	K	F	G	G	R	S	G	353

Figura 5. Familia génica de MOT1 en *M. truncatula*. A) Arbol filogenético de las familias de transportadores SULTR y MOT1. B) Alineamiento de los motivos conservados en los miembros de la familia MOT1 en *M. truncatula*.

Además, estas proteínas también presentan los dos motivos conservados propios de todas las proteínas de la familia MOT1 identificadas hasta ahora (Tejada-Jiménez et al, 2007) (Figura 5 B). Estos resultados apoyan que las cinco secuencias encontradas en el genoma de *M. truncatula* pertenecen la familia MOT1, siendo buenos candidatos para mediar el transporte de Mo en *M. truncatula*. Por tanto, a partir de ahora nombramos a estas proteínas como MOT1.1 a MOT1.5. (Tabla 14).

Tabla 14. Genes MOT1 en *M.truncatula*

Nombre del gen	Código del gen
<i>MtMOT1.1</i>	<i>Medtr1g010210</i>
<i>MtMOT1.2</i>	<i>Medtr1g010270</i>
<i>MtMOT1.3</i>	<i>Medtr3g464210</i>
<i>MtMOT1.4</i>	<i>Medtr4g011600</i>
<i>MtMOT1.5</i>	<i>Medtr3g108190</i>

El número de miembros de la familia MOT1 encontrados en *M. truncatula* es superior a lo encontrado en otras plantas no leguminosas como es el caso de *A. thaliana* donde hay dos miembros de esta familia MOT1 codificados en su genoma (Baxter et al, 2008; Gasber et al, 2011; Tomasu et al, 2007). Para comprobar si se trata de una característica común a las leguminosas, analizamos los posibles transportadores de la familia MOT1 presentes en los genomas de distintas plantas, encontrando que el número de estos genes es el doble de media en leguminosas que en no leguminosas (Tabla 15). Esto podría sugerir un papel relevante de los transportadores de la familia MOT1 en leguminosas, que tienen como principal diferencia respecto a plantas no leguminosas unos órganos que actúan como sumideros adicionales de molibdeno: los nódulos.

Tabla 15. Número de genes que codifican miembros de la familia MOT1 en plantas leguminosas y no leguminosas.

Leguminosas	Miembros de la familia MOT1	No leguminosas	Miembros de la familia MOT1
<i>Arachis duranensis</i>	3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
<i>Cajanus cajan</i>	3	<i>Hordeon vulgare</i>	2
<i>Cicer arietinum</i>	4	<i>Populus tricarpa</i>	2
<i>Glycine max</i>	9	<i>Ricinus communis</i>	3
<i>Medicago truncatula</i>	5	<i>Solanun tuberosum</i>	2
<i>Pisum sativum</i>	4	<i>Sorghum bicolor</i>	3
<i>Vigna angularis</i>	5	<i>Vitis vinifera</i>	2
<i>Phaseolus vulgaris</i>	4	<i>Zea mays</i>	2
Media	4,62	Media	2,25

Para tratar de determinar si alguno de los posibles transportadores de molibdato de *M. truncatula* podría estar implicado en el suministro de molibdeno a los nódulos para la FSN se llevo a cabo un análisis transcripcional de estos genes mediante qRT-PCR en plantas fertilizadas con nitrógeno y plantas noduladas tras la inoculación con el rizobio *S. meliloti* (Figura 6). *MtMOT1.3* (Figura 6 C) se expresa exclusivamente en los nódulos, mientras que *MtMOT1.2* (Figura 6 B) tiene expresión principalmente en nódulos y en raíces de plantas noduladas. Este patrón de transcripción en órganos directamente relacionados con la FSN apunta a un papel de MOT1.2 y MOT1.3 en dicho proceso, probablemente en el transporte de Mo al nódulo. Por el contrario, *MtMOT1.1*, *MtMOT1.4* y *MtMOT1.5* presentan expresión en diferentes órganos de la planta, tanto en condiciones de fertilización con nitrato como de fijación de nitrógeno (Figura 6 A, D y E), lo que podría indicar una implicación más general en la distribución de molibdeno a otros órganos. Este patrón de expresión es semejante al observado en AtMOT1, transportador familia MOT1 descrito en *A. thaliana*, que se expresaban en distintas partes de la planta como raíces, hojas, silicuas, semillas, flores etc (Baxter et al, 2008; Tomasu et al, 2007). Atendiendo a su patrón de transcripción, *MtMOT1.2* y *MtMOT1.3* son los mejores candidatos para mediar el transporte de Mo al nódulo de *M. truncatula*. Por ello, en este trabajo nos centramos en la caracterización de estas proteínas de la familia MOT1 para confirmar su papel en la FSN.

Figura 6. Expresión génica de la familia MOT1 de *M. truncatula*. Expresión relativa mediante qPCR en la raíz y partes aéreas de plantas fertilizadas y en raíz, partes aéreas y nódulos de plantas noduladas, relativizadas al gen de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*. Los datos son la media $\pm$ de 2 experimentos independientes.

2. MtMOT1.3

Como se ha indicado anteriormente, de entre los cinco miembros de la familia MOT1 en *M. truncatula*, *MtMOT1.3* es el que presenta una expresión más claramente relacionada con la fijación simbiótica de nitrógeno, ya que se transcribe específicamente en nódulos (Figura. 6 C). Por esta razón decidimos comenzar con la caracterización de este posible transportador de Mo. Primero, y dado que entre los distintos miembros de la familia MOT1 es posible encontrar genes regulados por la presencia de molibdeno en el medio, como AtMOT1 (Tomatsu et al., 2007) y otros cuya expresión no se ve afectada por la concentración de este elemento en el medio como CrMOT1 (Tejada-Jiménez et al., 2007), se decidió evaluar si la expresión de *MtMOT1.3* es dependiente de la disponibilidad de este molibdeno. Para ello se crecieron plantas de *M. truncatula* en medios con diferentes concentraciones de molibdato y se realizó un análisis transcripcional por qRT-PCR empleando material de los nódulos de dichas plantas. Se observó que la expresión de *MtMOT1.3* no varía significativamente al cambiar la concentración de molibdato (Figura 7). Por lo tanto, la *MtMOT1.3* no se regula por la disponibilidad de Mo al igual que ocurría con CrMOT1 (Tejada-Jiménez et al., 2007).

Figura 7. Expresión de *MtMOT1.3* en función de la concentración de molibdeno. La expresión relativa se calculó empleando el gen *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa* como estándar interno. Los datos son la media ± ES de tres experimentos independientes.

2.1. MtMOT1.3 es un transportador de molibdato

Todos los transportadores de molibdato de la familia MOT1 que se han identificado tanto en plantas como en algas median el transporte de dicho anión hacia el citosol (Tejada-Jiménez et al., 2013). *MtMOT1.3* presenta una alta homología de secuencia con las proteínas MOT1 ya caracterizadas, y además posee los dominios característicos de esta familia de transportadores de molibdato. Para confirmar que *MtMOT1.3* también posee esta actividad de transporte se

llevó a cabo la expresión heteróloga de este transportador en *S. cerevisiae*. Esta levadura es uno de los pocos organismos que carece de molibdoenzimas y no emplea este elemento en su metabolismo. Por esta razón *S. cerevisiae* carece de transportadores de molibdeno endógenos y la acumulación de Mo es tóxico para ellas (Mendel & Bittner, 2006; Mendel, 2013). Se transformó la cepa 31019b de *S. cerevisiae* con el cDNA que codifica MtMOT1.3, en el vector de expresión en levaduras pDR196. Además como control se empleó esa misma cepa de levadura transformada con el vector vacío. Las levaduras transformadas con MtMOT1.3 mostraron mayor sensibilidad a molibdato que las transformadas con el vector vacío, tanto en condiciones de crecimiento en medio sólido (Figura 8 A), como en medio líquido (Figura 8 B).

Figura 8. Test de crecimiento de *S. cerevisiae* expresando MtMOT1.3. A) La cepa de levadura *S. cerevisiae* 31019b transformada con pDR196::MtMOT1.3 o con pDR196 vacío fue crecida durante 3 días a 28 °C en diluciones seriadas (10 veces cada vez) en medio SD sólido sin molibdato añadido o con 50 µM de molibdato sódico (Na₂MoO₄). B) Las cepas de levadura empleadas en A) fueron crecidas en medio SD líquido sin molibdato añadido y con distintas concentraciones de molibdato sódico (10, 30, 50, 100 y 1000 µM) a 28 °C durante 42 h. El crecimiento de las levaduras se evaluó realizando medidas a DO₆₀₀ cada 3 horas.

La expresión de *MtMOT1.3* causó toxicidad en presencia de 50 μM de molibdato provocando una inhibición del crecimiento que no ocurrió en las levaduras transformadas con el plásmido vacío. En un medio al cual no se le añadió molibdato exógeno no se observó diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 8).

Mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), determinamos el contenido de Mo intracelular en los cultivos de levaduras usados, observando una mayor concentración de dicho metal en las estirpes que expresaban *MtMOT1.3* comparado con las estirpes transformadas con el vector vacío (Figura 9 A).

Figura 9. Ensayo de transporte de molibdato de *MtMOT1.3*. A) Contenido de Mo en la cepa de levadura *S. cerevisiae* 31019b transformada con pDR196::MtMOT1.3 o con pDR196 vacío tras crecer durante 42 horas a 28°C. Los datos son la media $\pm$ ES de 2 experimentos independientes. B) Adquisición de Mo por la cepa de levadura *S. cerevisiae* 31019b transformada con pDR196::MtMOT1.3 tras crecer durante 42 horas a 28 °C. C) Efecto del sulfato en la absorción de molibdato por parte de las cepa de levadura *S. cerevisiae* 31019b transformada con pDR196::MtMOT1.3. Estas levaduras fueron crecidas durante 42 horas a 28 °C en medio SD con 500 nM de molibdato sódico y tres concentraciones distintas de sulfato sódico (0, 0,2 y 2 mM). Los datos se han referido al valor a 0 mM de sulfato sódico (100% = 72,1 pmol de Mo/10⁶ células · h).

Por tanto el efecto tóxico observado anteriormente sería debido a la mayor acumulación de molibdato en el interior de las levaduras que expresan *MtMOT1.3*. Dicha acumulación se ajustó a una cinética michaeliana que nos permitió determinar tanto la $v_{\max} = 63,2 \text{ pmol}/10^6 \text{ células} \cdot \text{hora}$ como la constante de Michaelis $k_{1/2} = 378,5 \text{ nM}$ (Figura 9 B). Además, para comprobar la

especificidad de MtMOT1.3 hacia su sustrato se llevó a cabo un ensayo de inhibición en el que se pudo observar que la presencia de hasta 4000 veces más de sulfato (Na_2SO_4) que de molibdato no provocaba inhibición en el transporte de este último (Figura 9 C). Estos resultados indican que MtMOT1.3, al igual que el resto de miembros de la familia MOT1, media el transporte de molibdato mediante un proceso específico y de alta afinidad.

2.2. MtMOT1.3 se expresa en la membrana plasmática de las células de la interzona y la zona de fijación de los nódulos

Los nódulos son órganos complejos con distintos tipos celulares y zonas (Figura 1), por esta razón la localización de MtMOT1.3 es clave para determinar cuál es su función biológica específica y, por tanto, establecer su posible relación con el transporte de molibdeno para la FSN. Como primera aproximación se llevó a cabo una estrategia de localización mediante la fusión de 1,1 Kb correspondientes al promotor de *MtMOT1.3* al gen de la β -glucoronidasa (*gus*) (Figura 10).

Figura 10. Localización tisular de *MtMOT1.3*. A) Detección de la actividad GUS en el nódulo de *M. truncatula* transformado con el plásmido pGWB3 que contiene el gen *gus* bajo el control del promotor de *MtMOT1.3*. B) Detección de la actividad GUS en una sección de nódulo de *M. truncatula* transformado con el plásmido pGWB3 que contiene el gen *gus* bajo el control del promotor de *MtMOT1.3*. C) Expresión de *MtMOT1.3* en nódulos de *M. truncatula* mediante microdissección laser y secuenciación de ARN (base de datos de Symbimics, <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>). Meris = meristemo, Infec = infección, Difer = diferenciación, Inter = interzona, Fij = fijación. A y B) barra de escala = 200 μm .

Con esta construcción se transformaron plantas de *M. truncatula* y se analizó la actividad del promotor de *MtMOT1.3* en nódulos a los 28 días post-inoculación (dpi). La actividad GUS se detectó en la interzona y la zona de fijación temprana del nódulo (Figura 10 A y B). Este mismo patrón de expresión de *MtMOT1.3* es el que aparece en la base de datos de Symbimics, cuyos datos son obtenidos mediante microdissección láser y posterior análisis RNA-seq (Roux et al, 2014) (Figura 10 C).

La localización de la proteína MtMOT1.3 se llevó a cabo primeramente empleando técnicas de inmunolocalización y visualización mediante microscopía confocal. Se obtuvo una construcción con el gen *MtMOT1.3* fusionado a tres epítomos de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal de la proteína, bajo el control de 1,1 Kb correspondientes al promotor de *MtMOT1.3*. (Figura 11).

Figura 11. Localización subcelular de MtMOT1.3-HA. A) Sección longitudinal de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína GFP (verde) y transformado con el vector pGWB13 que contiene MtMOT1.3 fusionado a tres epítomos HA bajo el control de su propio promotor (rojo). a, Meristemo; b, infección/diferenciación; c, interzona y d, fijación. Barras de escala = 200 μ m. B) Ampliación de la región de fijación de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi transformado con pGWB13::MtMOT1.3-HA (rojo) e infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente GFP (verde). El ADN se tiñó empleando DAPI (azul). Barras de escala = 50 μ m. C) Detalle de una célula infectada de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente mCherry (rojo). Este nódulo fue transformado con pGWB13::MtMOT1.3-HA (verde) y el ADN se tiñó empleando DAPI (azul). Barras de escala = 10 μ m. De izq a dch: primeros paneles muestran Alexa 594 en rojo (A,B) o Alexa 488 en verde (C), paneles centrales GFP (A,B) o mCherry (C) de *S. meliloti*, paneles finales sobreposición con microscopía de transmisión (A) o DAPI (B,C).

Plantas de *M. truncatula* se transformaron con esta construcción y se inocularon con el rizobio *S. meliloti* pHC60 que expresa constitutivamente la proteína GFP (fluorescencia verde). Los nódulos de estas plantas se analizaron a 28 dpi. La señal de MtMOT1.3 HA detectada empleando el fluoróforo rojo Alexa 594 se encontraba localizada en la interzona y zona de fijación del nódulo (Figura 11 A). A nivel celular, la señal correspondiente a MtMOT1.3 estaba localizada en la periferia de las células infectadas y no infectadas, en lo que podría ser la membrana plasmática (Figura 11 B). La localización a nivel celular también se realizó empleando el fluoróforo verde Alexa 488 (Figura 11 C). Para confirmar la especificidad de la señal observada se se emplearon, en ambos casos, secciones de los mismos nódulos y raíces que no fueron incubadas con el anticuerpo primario, pero si con el secundario. En todos los casos fue imposible detectar señal (Figura 12).

A

B

Figura 12. Control de autofluorescencia de la localización subcelular de MtMOT1.3-HA. A) Sección longitudinal de nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína GFP (verde) y transformado con el vector pGWB13 que contiene MtMOT1.3 fusionado a tres epítopos HA bajo el control de su propio promotor. Barras de escala = 10 μ m. Panel superior izq DAPI, panel inferior derecho GFP (*S. meliloti* pHC60), panel superior derecho Alexa 594 (MtMOT1.3-HA) y panel inferior derecho transiluminación. B) Detalle de una sección de nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente mCherry (rojo) y transformado con el vector pGWB13 que contiene MtMOT1.3 fusionado a tres epítopos HA bajo el control de su propio promotor. Barras de escala = 50 μ m. El ADN se tiñó empleando DAPI (azul). Los paneles muestran de izq a dcha: DAPI, mCherry (*S. meliloti*), Alexa 488 (MtMOT1.3-HA) y transiluminación.

Para confirmar esta localización subcelular, se llevó a cabo una expresión transitoria en plantas de tabaco (*N. benthamiana*) de MtMOT1.3 fusionado a GFP bajo el control de un promotor 35S. Estas plantas se co-infiltraron con un marcador de membrana plasmática fusionado a una

proteína fluorescente cian (pBIN-CFP). La señal de MtMOT1.3 y del marcador de membrana plasmática colocalizaron en las células de la epidermis de las hoja de tabaco, apoyando la localización de MtMOT1.3 en membrana plasmática (Figura 13 A). Como controles negativos de este experimento se agroinfiltraron hojas de tabaco empleando únicamente el marcador de membrana (pBIN-CFP) (Figura 13 B) o la construcción MtMOT1.3-GFP (Figura 13 C).

Figura 13. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con MtMOT1.3-GFP. A) Localización de MtMOT1.3-GFP expresado transitoriamente en células de Tabaco (verde) y del marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP (cyan). B) Control de autofluorescencia de marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP (cyan). C) Control de autofluorescencia de marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP (cyan). Barra de escala = 25 μ m. Los paneles muestran de izq a dcha: MOT1.3-GFP, AtPIP2-CFP y superposición de los primeros dos paneles con transiluminación.

Además de los ensayos de inmunolocalización por microscopia confocal y de expresión transitoria en hojas de tabaco para ratificar la localización de MtMOT1.3 se realizaron ensayos de western blot en los cuales se usaron extractos protéicos de nódulo y raíz (Figura 14 A), y de nódulo y aislado de simbiosomas (Figura 14 B). MtMOT1.3 solo se detectó en extractos de nódulo en ambos casos, descartando su localización en raíz o en la membrana del simbiosoma. En el caso de MtMOT1.3 todos los resultados expuestos apuntarían a que se localiza en la membrana plasmática de las células infectadas y no infectadas de la zona de fijación y la interzona del nódulo.

Figura 14. Inmunodetección de MtMOT1.3 mediante Western Blot. A) Inmunodetección de MtMOT1.3-HA en extracto crudo de proteínas de raíz y nódulo de plantas de *M. truncatula* a 28 dpi transformadas con el vector pGWB13 vacío o con pGWB13::MtMOT1.3. B) Inmunodetección de MtMOT1.3 en extracto crudo (EC) de proteína de nódulos y en extracto purificado de simbiosoma (ES) de nódulos de *M. truncatula* a 28 dpi transformadas con el vector pGWB13::MtMOT1.3. VAMP172-e se utilizó como control de la presencia de simbiosoma.

2.3. La mutación de *MtMOT1.3* afecta a la capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis con *S. meliloti*

Con el fin de estudiar el papel fisiológico de MtMOT1.3 se obtuvo la línea mutante NF10801 (*mot1.3-1*) de la colección de mutantes de *M. truncatula* del Noble Research Institute (Ardmore, EEUU). Estas líneas mutantes contienen un elemento transponible de *N. tabacum* (*Tnt1*) (Tadege et al., 2008). En la línea *mot1.3-1* la inserción del transposón se encuentra en el segundo exón del gen, en la posición +1782 desde el codón de inicio (Figura 15 A). Para evaluar la expresión de *MtMOT1.3* en esta línea mutante se realizó una PCR empleando como molde ADNc de plantas mutantes. En ellas no se detectó presencia del transcrito de *MtMOT1.3* (Figura 15 B). Dado que MtMOT1.3 se expresa exclusivamente en nódulos se puede hipotetizar que este transportador tiene un papel dentro de la FSN. Para tratar de determinar cuál es dicha función, las plantas mutantes *mot1.3-1* se crecieron en condiciones de suficiencia de molibdeno (4 nM Mo) y en condiciones sin molibdeno añadido (0 nM Mo). Aquellas plantas crecidas con un aporte suficiente de molibdeno no mostraron diferencias con respecto a las plantas control. Se evaluaron diferentes parámetros: biomasa y crecimiento, peso seco, , actividad de la enzima nitrogenasa, número de nódulos por planta y longitud del nódulo (Fig 15). Sin embargo, las plantas mutantes crecidas en deficiencia de molibdeno presentaban una reducción en la biomasa (Figura 15 C y D) así como una reducción de alrededor del 50% en la actividad de la enzima nitrogenasa, (Figura 15 E). También se observó que, aunque no había diferencias en el número de nódulos por planta (Figura 15 F), los nódulos de plantas mutantes eran significativamente más pequeños que los de plantas control (Figura 15 G). Se obtuvo un resultado similar al crecer estas plantas en medio hidropónico, donde las concentraciones de molibdeno pueden ser controladas de manera más precisa (Figura 16).

Figura 15. Fenotipo del mutante *mot1.3-1* en condiciones simbióticas. A) Posición de la inserción del *Tnt1* dentro del gen *MtMOT1.3*, para dar lugar a la línea mutante *mot1.3-1*. B) Expresión por RT-PCR de *MtMOT1.3* en nódulos de *M. truncatula* de 28 dpi de plantas control y de plantas de la línea mutante *mot1.3-1*. Como control de esta PCR se empleó el gen de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*. C) Crecimiento de plantas control y mutantes *mot1.3-1* en condiciones de suficiencia (4 nM Mo) y deficiencia (sin Mo añadido) de molibdeno. Barra de escala = 3 cm. D) Número de nódulos por planta. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 6 plantas individuales. E) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 6 plantas individuales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. F) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28 dpi. La reducción de acetileno se midió por duplicado en 2 sets de 4 plantas, los datos son la media $\pm$ ES. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$. G) Longitud de los nódulos de 28 dpi. Los datos son la media $\pm$ ES de 15 nódulos de 6 plantas diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$.

Figura 16. Fenotipo del mutante *mot1.3-1* en condiciones simbióticas y cultivo hidropónico. A) Crecimiento de plantas control y mutantes *mot1.3-1* en condiciones de suficiencia (4 nM Mo) y deficiencia (sin Mo añadido) de molibdeno. Barra de escala = 3 cm. B) Número de nódulos por planta. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 7 plantas individuales. C) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 8 plantas individuales. D) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28 dpi. La reducción de acetileno se midió por duplicado en 2 sets de 4 plantas, los datos son la media $\pm$ ES. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,05$.

Para confirmar que el fenotipo observado se debía exclusivamente a la ausencia de MtMOT1.3 en las plantas de la línea mutante *mot1.3-1*, éstas fueron transformadas empleando una construcción que incluía el gen *MtMOT1.3* bajo el control de 1,1 kb de su propio promotor unida a tres epítomos HA, la misma construcción que fue empleada para llevar a cabo la localización por microscopía confocal. Al introducir *MtMOT1.3* en plantas mutantes *mot1.3-1* se observó una recuperación parcial del fenotipo que éstas presentaban en condiciones de baja disponibilidad de Mo (Figura 17). De esta manera se recuperaron el crecimiento general (Figura 17 A y B), el tamaño de los nódulos (Figura 17 C) y la actividad nitrogenasa (Figura 17 E y F) en comparación con plantas control. Además se midió mediante ICP-MS el contenido de molibdeno de los diferentes órganos de las plantas control, mutantes *mot1.3-1* y mutantes transformadas con el gen silvestre *mot1.3-1::MtMOT1.3*. Se observó que estas últimas presentaban un contenido de molibdeno semejante a los de plantas silvestres mientras que en los nódulos de las plantas mutantes se producía una acumulación de este elemento (Figura 17 E).

Figura 17. Complementación genética de plantas *mot1.3-1* transformadas con *MtMOT1.3* en condiciones de insuficiencia de molibdeno. A) Crecimiento de plantas control, mutantes *mot1.3-1* y mutantes *mot1.3-1* transformadas con *MtMOT1.3* (*mot1.3-1::MtMOT1.3*). Barra de escala = 3 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media ± ES de al menos 6 plantas independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C) Nódulos representativos de plantas control, mutantes *mot1.3-1* y mutantes *mot1.3-1* transformadas con *MtMOT1.3* (*mot1.3-1::MtMOT1.3*) de 28 dpi. Barra de escala = 500 μm. D) Número de nódulos por planta. Los datos son la media ± ES de al menos 6 plantas individuales. E) Contenido de molibdeno en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas control, mutantes *mot1.3-1* y mutantes *mot1.3-1* transformadas con *MtMOT1.3* (*mot1.3-1::MtMOT1.3*). Los datos son la media ± ES de al menos 4 plantas individuales. F) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28 dpi. La reducción de acetileno se midió por duplicado en 2 sets de 4 plantas, los datos son la media ± ES. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,05$. H) Actividad nitrogenasa por nódulo de 28 dpi de plantas control, mutantes *mot1.3-1* y mutantes *mot1.3-1* transformadas con *MtMOT1.3* (*mot1.3-1::MtMOT1.3*). La reducción de acetileno se midió por duplicado en 2 sets de 4 plantas, los datos son la media ± ES.

Dado el menor tamaño observado en los nódulos de las plantas mutantes se decidió evaluar si pudieran existir alteraciones tanto en el proceso de nodulación como en el desarrollo del nódulo. Se estudió la anatomía de los nódulos del mutante *mot1.3-1* y la cinética de nodulación de estas plantas. Anatómicamente los nódulos mutantes (Figura 18 A) no presentaban diferencias con respecto de los nódulos de plantas control (Figura 18 B). Tanto las plantas mutantes como las control comenzaban a presentar los primeros primordios de nódulos en torno a los 8 días post inoculación y el desarrollo de los mismos no presentaba diferencias entre ambas (Figura 18 C y D).

Figura 18. Desarrollo de los nódulos de plantas control y mutantes *mot1.3-1*. Secciones longitudinales de nódulos de 28 dpi de plantas control A) y mutantes *mot1.3-1* B) teñidas con azul de toluidina. Barras = 100 μ m. C) Cinética de nodulación de plantas control y mutantes *mot1.3-1*. Los datos son la media $\pm$ ES de 10 plantas. D) Desarrollo de los nódulos de plantas control (izq) y mutantes *mot1.3-1* (dcha). Barras de escala = 100 μ m.

Teniendo lo expuesto en este apartado y la presencia de otros cuatro genes pertenecientes a la familia MOT1 en *M. truncatula* es posible hipotetizar que la ausencia de MtMOT1.3 intente ser compensada con la sobreexpresión de cualquiera de los otros transportadores de la familia MOT1. Para comprobar si se producía esta alteración en la expresión se llevó a cabo un análisis transcripcional mediante qRT-PCR a partir de material de nódulo de plantas mutantes *mot1.3-*

1. Se evaluó la expresión de los restantes miembros de la familia MOT1 de *M. truncatula* y se observó que ninguno de ellos se encontraba sobreexpresado en los nódulos de los mutantes *mot1.3-1* (Figura 19).

Figura 19. Expresión de *MtMOT1.1*, *MtMOT1.2*, *MtMOT1.4* y *MtMOT1.5* en nódulos de 28 dpi de plantas mutantes *mot1.3-1*. Las expresiones fueron calculadas empleando como estándar interno el gen de referencia *ubiquitina carboxil-terminal* y se relativizaron a los valores de dichas expresiones en plantas control (100%). Los datos son la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes, empleándose en cada uno de ellos material de 4 plantas individuales.

2.4. La mutación de *MtMOT1.3* no afecta significativamente a otros procesos en *M. truncatula*.

Dado que la expresión de *MtMOT1.3* es exclusiva de nódulos y *a priori* su mutación no debería afectar otros procesos de la planta en los cuales estuvieran implicadas molibdoenzimas. Para corroborar esta hipótesis se crecieron plantas de la línea mutante *mot1.3-1* en condiciones no simbióticas (Figura 20). Para ello se suplementó la solución de riego con nitrato potásico. En estas condiciones, la nodulación se ve inhibida, y la única fuente de nitrógeno disponible para la planta es el nitrato (Bernard & Habash, 2009). El proceso de reducción de nitrato a amonio es catalizado por la molibdoenzima nitrato reductasa, que se expresa principalmente en partes aéreas de la planta. En estas condiciones de crecimiento no se observaron diferencias significativas entre las plantas mutantes *mot1.3-1* y las plantas control en términos de crecimiento y biomasa (Figura 20 A y B). Se evaluó la actividad de la nitrato reductasa y tampoco se encontraron diferencias significativas entre plantas mutantes y silvestres (Figura 20 C). Por tanto, la actividad de transporte mediada por *MtMOT1.3* solo sería importante en nódulos y no para otros procesos de la planta.

Figura 20. Las plantas mutantes *mot1.3-1* no se diferencian fenotípicamente de las silvestres en condiciones no simbióticas. A) Crecimiento de plantas control y *mot1.3-1*. Barra de escala = 3 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 8 plantas independientes. C) Actividad de la enzima nitrato reductasa. La reacción de reducción de nitrato se midió por duplicado. Los datos son la media $\pm$ ES.

3. MtMOT1.2

Además de *MtMOT1.3*, el único de los genes de la familia MOT1 de *M. truncatula* que se expresaba exclusivamente en nódulo, *MtMOT1.2* mostró un patrón de transcripción que sugiriera un papel relevante en el nódulo o en procesos ligados con éste (Figura 6); puesto que: 1) dicho gen tiene su máxima expresión en el nódulo, 2) se expresa más en raíces de plantas noduladas que de plantas no noduladas, y 3) no presenta expresión en la parte aérea de la planta (Figura 6 B). Por esta razón nos centramos en su caracterización como un buen candidato para mediar el transporte de molibdeno al nódulo para asegurar la actividad fijadora de nitrógeno.

3.1. MtMOT1.2 es un transportador de molibdato

MtMOT1.2, al igual que el resto de transportadores de la familia MOT1 presenta en su secuencia de aminoácidos los dos dominios conservados relacionados con el transporte de molibdato característicos de la familia MOT1 (Figura 5 B). Para analizar la posible actividad de transporte de molibdato de MtMOT1.2 se llevó a cabo un ensayo de expresión heteróloga en levaduras. (Figura 21).

Figura 21. MtMOT1.2 introduce molibdato al citosol celular. A) Adquisición de molibdato por la cepa de *S. cerevisiae* 31019b transformada con la secuencia codificante de *MtMOT1.2* en el vector de expresión pDR196. Las levaduras fueron crecidas durante 24 h a 28 °C. B) Efecto del sulfato en la absorción de molibdato por parte de la cepa de levadura *S. cerevisiae* 31019b transformada con el plásmido pDR196::*MtMOT1.2*. Estas levaduras fueron crecidas en medio SD con 500 nM de molibdato sódico y tres concentraciones distintas de sulfato sódico (0, 0,2 y 2 mM), a 28 °C durante 42 h.

La cepa *S. cerevisiae* 31019b fue transformada con el vector pDR196 que incluía la región codificante de *MtMOT1.2*. En este ensayo se empleó como control la misma cepa *S. cerevisiae* pero transformada con el vector pDR196 vacío. Estas levaduras se crecieron en presencia de distintas cantidades de molibdato observándose una acumulación de Mo que seguía una cinética de Michaelis-Menten. Esto permitió calcular una $V_{\text{max}} = 155 \pm 12 \text{ pmol} / 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ y una $k_{1/2} = 488 \pm 105 \text{ nM}$ (Figura 21 A). Además, mediante un ensayo de competición, se comprobó

que este transporte no se inhibía en presencia de concentraciones 4.000 veces mayores sulfato que de molibdato (Figura 21 B), a pesar de ser ambos aniones muy similares en cuanto a radio, carga y tamaño inónico. Estos resultados sugieren que MtMOT1.2 tiene actividad de transporte de molibdato hacia el interior del citosol, siendo dicha actividad de alta afinidad y especificidad por el sustrato.

3.2. *MtMOT1.2* se expresa en los haces vasculares de raíces y nódulos de *M. truncatula*.

Con la finalidad de conocer la expresión tisular de *MtMOT1.2* se llevó a cabo un ensayo de determinación de la actividad GUS. Para ello, se fusionó un fragmento de 1.446 pb correspondiente al promotor de *MtMOT1.2* con el gen de la β -glucoronidasa (Figura 22).

Figura 22. Localización tisular de *MtMOT1.2*. A) Detección de la actividad GUS un nódulo y raíces de *M. truncatula* transformados con el plásmido pGWB3 con el gen *gus* bajo el control del promotor de *MtMOT1.2*. Barra de escala = 0,5 mm. B) Detección de la actividad GUS en una sección de raíz de *M. truncatula* transformado con el plásmido pGWB3 que contiene el gen *gus* bajo el control del promotor de *MtMOT1.2*. Barra de escala = 0,025 mm. C) Expresión de *MtMOT1.2* en una sección de nódulo de *M. truncatula* transformado con el plásmido pGWB3 que contiene el gen *gus* bajo el control del promotor de *MtMOT1.2*. Barra de escala = 25 μ m. D) Misma sección de un nódulo de *M. truncatula* blanqueada con lejía. Barra de escala = 25 μ m.

Con esta construcción se transformaron plantas de *M. truncatula* que fueron recogidas a 28 dpi. La señal de la actividad GUS se podía apreciar en los haces vasculares del nódulo y de la raíz (Figura 22 A). Se realizaron secciones de los nódulos y raíces, en estas últimas pudo

observarse que la mayoría de la actividad GUS se encontraba localizada en la región cercana a la endodermis-periciclo (Figura 22 B). Las secciones de nódulo se clarificaron para confirmar que la actividad GUS se encontraba restringida a los haces vasculares y no se extendía a zonas internas del nódulo (Figura 22 C y D).

3.3. MtMOT1.2 se localiza en células de la endodermis de los nódulos y raíces de *M. truncatula*

Aunque el experimento expuesto en el apartado anterior permitió determinar que *MtMOT1.2* se expresaba en los haces vasculares de raíz y nódulo este tipo de metodología no permite determinar su localización subcelular. Para aclarar en qué células de los haces vasculares de nódulo y raíz se localiza MtMOT1.2 se llevó a cabo un ensayo de inmunolocalización y posterior análisis mediante microscopia confocal. Plantas de *M. truncatula* fueron transformadas con una construcción en la que se fusionó el gen completo *MtMOT1.2* (incluyendo 1.446 pb correspondientes a su propio promotor) a tres epítomos HA en su extremo C-terminal. Se empleó un anticuerpo primario anti-HA generado en ratón y un anticuerpo secundario rojo fluorescente Alexa 594 anti ratón. Estas plantas se inocularon con *S. meliloti* que expresaba constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). La señal de MtMOT1.2-HA se localizó en los haces vasculares del nódulo (Figura 23 A) y de la raíz (Figura 23 B), confirmando de esta manera los resultados mostrados en el apartado 3.3. Con el fin de determinar exactamente la capa celular en la que se encontraba la señal se empleó autofluorescencia para localizar la banda de Caspary, que se encuentra en las células de la endodermis, y se observó que la señal de MtMOT1.2-HA co-localizaba en dicha capa celular (Figura 23 C). Además la señal de MtMOT1.2-1-HA se detectó tanto en la periferia de las células como en una región perinuclear (Figura 23). Se confirmó que la señal observada era específica empleando como control negativo secciones de los mismos nódulos y raíces que fueron incubados exclusivamente con el anticuerpo secundario Alexa 594. En estas muestras no se detectó fluorescencia roja bajo las mismas condiciones de observación (Figura 23 D y E).

Figura 23. Localización de MtMOT1.2-HA mediante inmunodetección y microscopía confocal. A) Sección de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi expresando MtMOT1.2-HA e inoculado con *S. meliloti* pHc60 que expresa constitutivamente GFP (verde). MtMOT1.2-HA se detectó empleando un anticuerpo rojo fluorescente Alexa-594 (rojo). El ADN se tiñó empleando DAPI (azul). Barra = de escala 50 μ m. Los paneles de izq a derecha muestran: Alexa 595 (MtMOT1.2-HA), superposición Alexa 595 y GFP, superposición de Alexa 595, GFP y DAPI. B) Sección de una raíz de *M. truncatula* transformada con MtMOT1.2-HA, en la cual esta señal se detectó empleando un anticuerpo rojo fluorescente Alexa-594. La autofluorescencia del xilema se detectó en el canal azul. Barra = de escala 50 μ m. Los paneles de izq a derecha muestran: Alexa 595 (MtMOT1.2-HA), superposición Alexa595 y DAPI, superposición de Alexa 595, DAPI y transiluminación. Continúa en la siguiente página.

Con el propósito de determinar a qué estructura subcelular correspondían dichas señales se llevó a cabo una inmunolocalización por microscopía electrónica de transmisión. Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo anti-HA producido en conejo y como secundario un anticuerpo anti-conejo conjugado a partículas de oro de 15 nm. Se detectó la señal de MOT1.2-HA en la membrana plasmática y en un compartimento intracelular correspondiente al retículo endoplasmático (Figura 24 A). Como control negativo de este experimento se emplearon secciones de los mismos nódulos que fueron incubadas exclusivamente con el anticuerpo secundario. Como se puede apreciar en la figura 24 B no se observó señal inespecífica en esas muestras.

Figura 24. Localización subcelular de MtMOT1.2-HA mediante microscopía electrónica de transmisión. A) Secciones de un vaso de nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi transformadas con MtMOT1.2-HA. Las flechas indican la posición de las partículas de oro. Barras de escala = 250 nm (izquierda) y 500 nm (derecha). B) Control negativo de sección de un vaso de nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi transformadas con MtMOT1.2-HA. Barra de escala = 500 nm.

Figura 23. (Continuación) C) Sección de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi expresando MtMOT1.2-HA e inoculado con *S. meliloti* pHc60 que expresa constitutivamente GFP (verde). El ADN se tiñó empleando DAPI (azul). La banda de Caspary, señalada por las flechas, muestra autofluorescencia en el canal azul. Barra de escala = 25 μ m. Los paneles de izq a dcha muestran: superposición de DAPI, GFP y Alexa 594. MtMOT1.2-HA se detectó empleando un anticuerpo rojo fluorescente Alexa-594. D) Sección transversal de nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi infectado con *S. meliloti* que expresa constitutivamente la proteína GFP (verde) y transformado con el vector pGWB13 que contiene MtMOT1.2 fusionado a tres epítomos HA bajo el control de su propio promotor. Barras de escala = 20 μ m. Los paneles de izq a dcha muestran: transiluminación, Alexa 594, DAPI y GFP. E) Sección de una raíz de *M. truncatula* transformada con MtMOT1.2-HA. Barras de escala = 10 μ m. El ADN se tiñó empleando DAPI (azul). Los paneles de izq a dcha muestran: transiluminación, Alexa 594, y DAPI.

También se llevó a cabo la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con MtMOT1.2 fusionado a GFP (verde) en su extremo C-terminal. Se co-agroinfiltró el marcador de membrana AtPIP2 fusionado a CFP (cyan). La señal de MtMOT1.2 GFP y de AtPIP2 co-localizaban confirmando la localización de membrana plasmática de MtMOT1.2 (Figura 25 A). Para descartar que la señal observada se debiera a autofluorescencia se agroinfiltraron hojas de tabaco empleando exclusivamente el marcador de membrana plasmática (pBIN-CFP) (Figura 25 B) o la construcción MOT1.2-GFP (Figura 25 C). En ambos casos solo se detectó señal en los canales correspondientes a la construcción agroinfiltrada. Todos estos resultados apuntan a la membrana plasmática y el retículo endoplasmático de las células de la endodermis de los haces vasculares como la localización más probable de MtMOT1.2.

Figura 25. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con MtMOT1.2-GFP. A) Localización de MtMOT1.2-GFP (verde) y del marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP (cyan) expresados transitoriamente en células de tabaco. Barra de escala = 25 µm. B) Control de autofluorescencia de marcador de MtMOT1.2-GFP. Barra de escala = 50 µm. C) Control de autofluorescencia de marcador de membrana plasmática AtPIP2-CFP (cyan). Barra de escala = 100 µm. Los paneles muestran de izq a dcha: AtPIP2-CFP, MOT1.2-GFP y superposición de los dos primeros paneles más transiluminación.

3.4. La mutación de MtMOT1.2 afecta a la capacidad de fijar nitrógeno de las plantas de *M. truncatula* en simbiosis con *S. meliloti*.

Con el fin de comprobar el papel de MtMOT1.2 en la FSN se solicitaron al Noble Research Institute líneas mutantes en este gen. Fue posible identificar una línea mutante homocigota para *MtMOT1.2*, la línea NF9961 que se denominó *mot1.2-1*. Ésta presentaba la inserción del transposón *Tnt1* en el segundo exón de dicho gen, a 1576 pb del codón de inicial (Figura 26 A). No fue posible detectar transcritos de *MtMOT1.2* en la línea *mot1.2-1* mediante RT-PCR (Figura 26 B) o mediante qPCR (Figura 26 C).

Figura 26. Línea mutante en el gen *MtMOT1.2* por la inserción de *Tnt1*. A) Posición del lugar de inserción de *Tnt1* en *MtMOT1.2* en el mutante *mot1.2-1* (NF9961). B) Expresión de *MtMOT1.2* por RT-PCR en raíces y nódulos de plantas control y *mot1.2-1*. La expresión del gen de referencia *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa* fue utilizada como control para esta PCR. C) Expresión por qRT-PCR de *MtMOT1.2* en raíces y nódulos de *M. truncatula* de 28 dpi de plantas control y de plantas de la línea mutante *mot1.2-1* relativos al gen de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa*. Los datos son la media $\pm$ ES de dos experimentos independientes.

Para evaluar la función de MtMOT1.2 en la FSN se crecieron plantas mutantes *mot1.2-1*, en simbiosis con *S. meliloti* y en presencia de distintas condiciones de disponibilidad de Mo: en deficiencia (sin molibdato añadido), en suficiencia (4 nM de molibdato) y en exceso (100 nM de molibdato). Tanto en condiciones de deficiencia como con un aporte suficiente de molibdeno las plantas mutantes de la línea *mot1.2-1* mostraron un menor crecimiento y biomasa que las plantas control (Figura 27A y B). En estos casos la actividad de la enzima nitrogenasa en las plantas mutantes mostraba una reducción del 40% respecto a la de las plantas control (Figura 27 C). También se observó una reducción en el tamaño de los nódulos de las plantas *mot1.2-1*

en comparación con los de plantas control (Figura 27 D). Sin embargo, al crecer estas mismas plantas suplementadas con 100 nM de molibdato se observó una recuperación de el fenotipo de las plantas *mot1.2-1*, pasando éstas a presentar un crecimiento, actividad nitrogenasa y tamaño de nódulo similar a las plantas control (Figura 27).

Figura 27. Fenotipo del mutante *mot1.2-1* en condiciones simbióticas. A) Crecimiento de plantas control y mutantes *mot1.2-1* en condiciones de deficiencia (sin Mo añadido), suficiencia (4 nM Mo) y suplementación (100 nM Mo). Barra de escala = 3 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos diez plantas individuales. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$. C) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28 dpi. La reducción de acetileno se midió por duplicado en cuatro sets de cuatro plantas, los datos son la media $\pm$ ES. D) Peso fresco de los nódulos de 28 dpi de plantas control y mutantes *mot1.2-1*. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos diez plantas individuales. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$.

Dada la reducción en el tamaño y contenido de molibdeno de los nódulos de las plantas *mot1.2-1* se analizó si éstos presentaban alteraciones en la estructura en comparación con los nódulos de plantas control. Asimismo, también se evaluó la cinética de nodulación, tanto en el número de nódulos por planta como el grado de nodulación. Sin embargo, no se encontraron diferencias en dichos parámetros (Figura 28), lo que indicaría que MtMOT1.2 no está involucrado ni en la estructura ni en el desarrollo de la nodulación, debiéndose el menor tamaño de los nódulos en

el mutante *mot1.2-1* al bajo crecimiento general de la planta como consecuencia del bajo aporte de N mediante la FSN.

Figura 28. Desarrollo de los nódulos de plantas control y mutantes *mot1.2-1*. A) Secciones longitudinales de nódulos de 28 dpi de plantas control (izquierda) y mutantes *mot1.2-1* (derecha) teñidas con azul de toluidina. Barras de escala = 100 μ m. B) Cinética de nodulación de plantas control y mutantes *mot1.2-1*. Los datos son la media $\pm$ ES de 15 plantas.

Con el propósito de confirmar que el fenotipo observado en las plantas mutantes *mot1.2-1* se debía exclusivamente a la mutación de *MtMOT1.2*, se transformaron plantas mutantes empleando la misma construcción utilizada para la inmunolocalización: el gen completo *MtMOT1.2* bajo el control de su propio promotor, fusionado a tres epítomos HA. Las plantas complementadas *mot1.2-1::MtMOT1.2* mostraron una recuperación parcial del crecimiento y la biomasa en comparación con las mutantes *mot1.2-1*. (Figura 29 A y B). El tamaño de los nódulos de las plantas complementadas también aumentó con respecto al de las plantas mutantes (Figura 29 C). Además, la actividad de la enzima nitrogenasa se restauró, alcanzando los niveles de la actividad encontrada en plantas control (Figura 29 D). Se midió el contenido de molibdeno en los distintos órganos (partes aéreas, raíces y nódulos) de plantas control, mutantes *mot1.2-1* y plantas complementadas *mot1.2-1::MtMOT1.2* y se observó que las plantas mutantes *mot1.2-1* presentaban una menor cantidad de molibdeno en nódulos, señal de que el transporte de este elemento hacia ese órgano se veía alterado por la ausencia de *MtMOT1.2*. Este fenotipo

se revirtió en el caso de las plantas transformadas con el gen silvestre, que presentaban un contenido de molibdeno en nódulos mucho mayor (Figura 29 E).

Figura 29. Complementación genética de plantas *mot1.2-1* transformadas con *MtMOT1.2*. A) Crecimiento de plantas significativas control, mutantes *mot1.2-1* y mutantes complementadas con el gen silvestre *mot1.2-1::MtMOT1.2* de 28 dpi. Barra de escala = 1 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces de plantas de 28 dpi control, mutantes *mot1.2-1* y mutantes complementadas *mot1.2-1::MtMOT1.2*. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos seis plantas independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$. C) Nódulos representativos a 28 dpi de plantas control, mutantes *mot1.2-1* y mutantes complementadas *mot1.2-1::MtMOT1.2*. Barra de escala = 0,5 mm. D) Actividad nitrogenasa de nódulos de 28 dpi. La reducción de acetileno se midió por duplicado en dos sets de seis plantas, los datos son la media $\pm$ ES. 100% = 0,161 nmol acetileno $\cdot$ h $^{-1}$ $\cdot$ planta $^{-1}$. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$. E) Concentración de Mo en partes aéreas, raíces y nódulos de plantas de 28 dpi control, *mot1.2-1* y *mot1.2-1::MtMOT1.2*. Los datos son la media $\pm$ ES de dos experimentos con al menos 6 plantas independientes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas $*p < 0,05$.

Para validar que el fenotipo observado en las plantas *mot1.2-1* se debía exclusivamente a la ausencia de *MtMOT1.2* se emplearon segregantes silvestres de la línea mutante NF9961. Las líneas mutantes producidas por el Noble Research Institute no presentan una única inserción del transposón *Tnt1*, sino que esta inserción se distribuye en distintas zonas del genoma un número de veces variable (Tadege et al., 2008). En concreto en la línea NF9961 hay otras 52 inserciones del *Tnt1* afectando a distintos genes. Para descartar que alguna de estas mutaciones pudiera ser responsable del fenotipo de las plantas *mot1.2-1* se emplearon segregantes silvestres de la línea mutante NF9961. Estas plantas no tienen ninguna de las dos copias del gen *MtMOT1.2* interrumpidas por la inserción del transposón *Tnt1* pero sí presentan el resto de inserciones en el genoma. Las plantas segregantes silvestres *mot1.2-1* (+/+) presentaban un crecimiento igual al de las plantas silvestres (Figura 30), lo que (junto con los resultados de complementación genética) apoyaría que la mutación en *MtMOT1.2* es la responsable del fenotipo de las plantas *mot1.2-1*.

Figura 30. Fenotipo del mutante *mot1.2-1* y de segregantes silvestres de la línea NF9961 en condiciones simbióticas. A) Crecimiento de plantas significativas control, mutantes *mot1.2-1* (-/-) y segregantes silvestres de la línea NF9961 *mot1.2-1* (+/+). Barra = 1 cm. B) Peso fresco de partes aéreas y raíces de plantas de 28 dpi control, mutantes *mot1.2-1* (-/-) y segregantes silvestres de la línea NF9961, *mot1.2-1* (+/+). Los datos son la media ± ES de al menos cinco plantas. C) Nódulos representativos de 28 dpi de plantas control, mutantes *mot1.2-1* (-/-) y segregantes silvestres de la línea NF9961, *mot1.2-1* (+/+). Barras de escala = 50 µm. D) Actividad

nitrogenasa de nódulos de 28 dpi de plantas significativas control, mutantes *mot1.2-1* (-/-) y segregantes silvestres de la línea NF9961, *mot1.2-1* (+/+). La reducción de acetileno se midió en plantas individuales, los datos son la media $\pm$ ES de al menos cinco plantas. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,05$.

3.5. La ausencia de *MtMOT1.2* no afecta significativamente al crecimiento de plantas en condiciones no simbióticas

La localización de *MtMOT1.2* en la endodermis de la raíz podría implicar un papel en la distribución de molibdeno, no solo hacia los nódulos, sino también hacia la parte aérea de la planta, donde hay otras proteínas dependientes de molibdeno como la enzima nitrato reductasa. Para comprobar cuál es el papel de *MtMOT1.2* en la distribución de molibdato hacia otros órganos de la planta distintos del nódulo se crecieron plantas mutantes *mot1.2-1* fertilizadas con nitrato (Figura 31).

Figura 31. Fenotipo del mutante *mot1.2-1* en condiciones no simbióticas. A) Crecimiento de plantas significativas control y *mot1.2-1*. Barra de escala = 1 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces de plantas control y *mot1.2-1*. Los datos son la media $\pm$ ES de 6 plantas de dos experimentos independientes. C) Actividad nitrato reductasa. La reducción de nitrato se midió por duplicado. Los datos son la media $\pm$ ES.

En estas circunstancias, en las que la única fuente de nitrógeno de la planta es el nitrato, el crecimiento de la misma depende de la reducción del nitrato a nitrito llevada a cabo por la molibdoenzima nitrato reductasa, para su posterior conversión en amonio. Sin embargo, como puede observarse en la figura 31 A y B no se observaron diferencias de crecimiento ni de

biomasa entre plantas *mot1.2-1* y plantas control crecidas en condiciones no simbióticas. Además, la actividad de la enzima nitrato reductasa tampoco se vio afectada en las plantas mutantes (Figura 31 C). Este mismo experimento se resultó se obtuvo en condiciones de bajo molibdeno, donde las plantas mutantes tampoco presentaron diferencias respecto a las plantas control (Figura 32). Este resultado apuntaría a que el transporte de molibdato mediado por MtMOT1.2 es importante para la planta solo en condiciones de fijación de nitrógeno, apoyando que dicho transportador tiene un papel fundamental en el aporte de Mo para la FSN.

Figura 32. Fenotipo del mutante *mot1.2-1* en condiciones no simbióticas y de deficiencia de Mo. A) Crecimiento de plantas significativas control y *mot1.2-1*. Barra de escala = 1 cm. B) Peso seco de partes aéreas y raíces de plantas control y *mot1.2-1*. Los datos son la media $\pm$ ES de al menos 6 plantas de dos experimentos independientes. C) Actividad nitrato reductasa. La reducción de nitrato se midió por duplicado. Los datos son la media $\pm$ ES

DISCUSIÓN

El molibdeno es esencial para la FSN ya que forma parte del centro activo de la nitrogenasa, la enzima que lleva a cabo la reducción de dinitrógeno a amonio (Seedfeldt et al., 2009). En la simbiosis leguminosa-rizobio esta reacción se produce en el interior de unos nuevos órganos, los nódulos. Estos representan un sumidero de nutrientes para la planta huésped ya que es ésta la que debe proporcionar los altos niveles de metabolitos necesarios para la FSN (Udvardi & Poole, 2013). Así, se puede hipotetizar que, para satisfacer la mayor demanda de este nuevo órgano diferenciado en las raíces, se hayan seleccionado mecanismos de refuerzo de la distribución de estos metales. Es dentro de este contexto como se podría explicar la duplicación de la familia de transportadores MOT1 observada en leguminosas, comparado con otras dicotiledóneas. Estas copias extras podrían haberse especializado en la entrega de molibdeno a los nódulos. De hecho en otros tipos de relaciones simbióticas que fijan nitrógeno parece ser frecuente la duplicación de miembros de la familia MOT1 (Li et al., 2018). Evidencia de esta especialización funcional en leguminosas es que no todos los transportadores de molibdeno participan en la FSN, como indica la caracterización de LjMOT1 (Duan et al., 2017). Este transportador, pese a expresarse en la epidermis y endodermis de la raíz y por tanto, ser candidato a estar involucrado en la captación de Mo del suelo y su entrega a los vasos, no juega ningún papel relevante en el uso de este elemento en nódulos. Por el contrario en esta Tesis Doctoral se han caracterizado dos transportadores de molibdato de la familia MOT1 en la leguminosa modelo *M. truncatula*, MtMOT1.2 y MtMOT1.3, están implicados en el transporte de molibdeno a los órganos fijadores de nitrógeno.

En el genoma *M. truncatula* se identificaron cinco posibles transportadores de la familia MOT1, que aparecían inicialmente anotados como transportadores de sulfato de la familia SULTR, con quienes está evolutivamente relacionados. Sin embargo estos presentan un dominio SALT conservado, relacionado con el transporte de sulfato, que no está presente en las proteínas de la familia MOT1, siendo sustituido por otros dos dominios relacionados con el transporte de molibdeno (Tejada-Jiménez et al., 2007). Los cinco MOT1 de *M. truncatula* no se expresan de igual modo en la planta. *MtMOT1.1*, *MtMOT1.4* y *MtMOT1.5* se expresan por toda la planta, lo que parece sugerir una implicación en la homeostasis global de molibdeno. Por el contrario, *MtMOT1.2* como *MtMOT1.3* presentan un patrón de expresión más relacionado con la FSN. *MtMOT1.3* se expresa exclusivamente en nódulos, mientras que *MtMOT1.2* lo hace tanto en la raíz como en el nódulo, aunque su expresión en raíz nodulada es mayor que en raíces de plantas en condiciones no simbióticas. Partiendo de estos patrones de expresión se hipotetizó que MtMOT1.2 y MtMOT1.3 pudieran estar relacionados con el transporte de molibdeno a los nódulos de *M. truncatula*.

Como primer paso, mediante la expresión heteróloga en levaduras se determinó que el molib-

dato es el sustrato de estos transportadores. La levadura *S. cerevisiae* es uno de los organismos que no expresan molibdoenzimas y carecen, por tanto, de transportadores de molibdeno, siendo la acumulación de este metal tóxica para estas célula (Mendel & Bittner, 2006). Como cabía esperar por los estudios de transporte de otros MOT1 en *C. reinhardtii* y *A. thaliana*, MtMOT1.2 y MtMOT1.3 introducen molibdato en el citoplasma celular. Sin embargo la tasa de transporte es extremadamente diferente. Mientras que AtMOT1 y CrMOT1 tienen una afinidad de 20 nM y 6,7 nM, los MOT1 de *M. truncatula* presentan casi 400 veces menos afinidad por el sustrato. Esto puede ser debido a su función, ya que AtMOT1 y CrMOT1 participan en la captación de Mo del medio donde este metal no suele ser muy abundante (Reddy & Gloss, 1993), mientras que MtMOT1.2 y MtMOT1.3 estarían recibiendo el metal de otros tejidos de la planta. Por el contrario la concentración de molibdeno debe ser mucho mayor que en el suelo, por lo que la afinidad de estos transportadores puede ser menor. No obstante aunque las afinidades por el sustrato de MtMOT1.2 y MtMOT1.3 son menores que otros miembros de la familia MOT1, están más cercanas a la descrita en LjMOT1 (Duan et al., 2017). Este transportador, al igual que CrMOT1 y AtMOT1 también parece estar implicado en la captación de molibdato del suelo a través de la raíz. La baja afinidad de LjMOT1 en comparación con AtMOT1 y CrMOT1 aún realizando una función parecida podría indicar que en *L. japonicus* existen otros transportadores de molibdato de mayor afinidad localizados en la raíz y que en esta leguminosa este MOT1 sería un sistema de transporte de baja afinidad. Este hecho explicaría además porque los mutantes *ljmot1* no ven afectada la FSN y muestran un crecimiento similar al de las plantas control independientemente del aporte de molibdeno que se las proporcione (Duan et al., 2017). Respecto a la capacidad de transporte de MtMOT1.2 y MtMOT1.3 también hay que destacar que su velocidad de transporte es mayor que la del resto de MOT1, lo que parece ser una respuesta para satisfacer la demanda de molibdeno de los bacteroides. Por último es importante señalar que la relativa baja afinidad por el sustrato tampoco parece un problema de cara a la competición con otros iones puesto que ni MtMOT1.2 ni MtMOT1.3 vieron afectada su capacidad para transportar molibdato en presencia de hasta 4000 veces más de sulfato, un anión con unas características físico-químicas muy similares al molibdato.

Con el fin de determinar el papel de MtMOT1.2 y MtMOT1.3 en el transporte de molibdato para la FSN se llevó a cabo su localización tisular en planta. Para la primera de las tareas se empleó un reportero transcripcional (*gus*) que mostró que MtMOT1.2 se localizaba en los vasos de las raíces y el nódulo, consistente con un papel en la distribución de Mo a los nódulos. MtMOT1.3, como se esperaba por los ensayos de qPCR, se localizaba en el nódulo, en las células de la interzona y zona de fijación. Esto representa una diferencia con respecto a los otros transportadores de metales identificados en *M. truncatula* ya que todos ellos se localizan en la zona de infección/diferenciación, (Tejada-Jiménez et al., 2015; Abreu et al., 2017; Senovilla

et al., 2018), lo que señala que la cesión de Mo ocurre cuando las condiciones para la fijación simbiótica de nitrógeno ya se han establecido.

Mayor detalle en la localización se logró fusionando tres epítomos de hemaglutinina para llevar a cabo experimentos de inmunolocalización. Mediante estos ensayos se observó que MtMOT1.3 se ubica en la membrana plasmática de células infectadas y no infectadas de nódulo. Para descartar que MtMOT1.3 estuviera localizado también en la membrana del simbiosoma o en la de la vacuola se emplearon otras técnicas de western blot y co-agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* con un marcador de membrana plasmática. El hecho de que MtMOT1.3 se localice en la membrana plasmática de células infectadas parece indicar que este transportador está implicado en introducir en dichas células molibdato, el cual se emplearía en la producción del FeMoco para la síntesis de la nitrogenasa. Respecto a la presencia de MtMOT1.3 en la membrana de células no infectadas es posible hipotetizar que en estas células el molibdeno se almacene, para que en una situación de déficit de este metal la planta pueda emplear estas reservas para evitar una disminución en la FSN. Otra posibilidad es que este molibdeno sea empleado para la síntesis de Moco, el cofactor de otras molibdoenzimas, que como la xantina deshidrogenasa que han sido detectadas en los nódulos determinados de *G. max* (Triplett, 1985). Aunque la presencia de esta enzima se debe a que en nódulos determinados parte del nitrógeno fijado se incorpora a la planta en forma de ureidos (Lodwig & Poole, 2003). MtMOT1.2 mostraba dos localizaciones subcelulares, por un lado la membrana plasmática y por otro lado un compartimento intracelular, que ensayos de microscopía electrónica de transmisión sugieren podría ser el retículo endoplasmático. Cabe destacar que esta doble localización subcelular coincide con la mostrada por la proteína MOT1 de *A. thaliana* (Tomatsu et al., 2007). La localización reticular de MtMOT1.2 podría deberse a la señal de la proteína recién sintetizada, esperando a ser movilizada a la membrana plasmática, su destino final. Alternativamente podría estar asociada a fenómenos de reciclaje del transportador como los descritos en AtIRT1 y en AtNRAMP1 (Barberon et al., 2011, Agorio et al., 2017). La localización en la membrana plasmática indicaría que MtMOT1.2 estaría mediando la entrada de molibdeno a las células de la endodermis desde el apoplasto. Curiosamente no se observó una distribución polar de este transportador, como si se ha visto en otros transportadores localizados en la raíz, por ejemplo AtBOR1 (Takano et al., 2010). Esta falta de polaridad indica que el flujo de molibdeno hacia las células infectadas estaría mediado por el efecto sumidero que desplazaría cualquier tipo de equilibrio químico en la dirección del nódulo. Asimismo representa un eficiente mecanismo de control del exceso de metal dado que una vez que este sumidero se llene, el equilibrio se desplazará hacia la recuperación del molibdeno. Por último estos ensayos de localización contrastan con los reportados por Baxter et al. (2008) que indican una localización mitocondrial.

Si MtMOT1.2 y MtMOT1.3 participan en la FSN su mutación debe afectar a la tasa de fijación de nitrógeno. Para determinarlo se usaron dos líneas mutantes *mot1.2-1* y *mot1.3-1*. Estas plantas se crecieron en dos condiciones distintas respecto a su fuente principal de nitrógeno. Unas fueron suplementadas con nitrato mientras que otras fueron inoculadas con rizobios para favorecer la FSN. En el caso de la plantas de línea *mot1.3-1* suplementadas con nitrato la hipótesis de partida sería que la ausencia de MtMOT1.3 no produjera un fenotipo, ya que estas plantas carecen de nódulos y este transportador se expresa exclusivamente en ellos. Este fue el resultado obtenido, al no observar diferencias significativas en el crecimiento y biomasa de las plantas mutantes *mot1.3-1* con respecto a las plantas silvestres. Además este resultado permite descartar el efecto de las múltiples inserciones que caracterizan a las líneas *Tnt1* (Tadege et al., 2008).

En el caso de las plantas de la línea *mot1.2-1* y teniendo en cuenta la localización radicular de MtMOT1.2, podría esperarse que la ausencia de este transportador comprometiera el suministro de molibdeno no solo a los nódulos, sino a otros órganos de la planta. Sin embargo, las plantas de esta línea mutante mostraron un crecimiento y biomasa similares a las plantas control al crecer en un medio rico en nitrato tanto en condiciones de suficiente molibdeno como al ser sometidas a un déficit de este metal, pese a que el crecimiento en estas condiciones depende de la actividad de la molibdoenzima nitrato reductasa (Bernard and Habash, 2009). Su actividad en hojas mostró unos niveles semejantes a los de plantas control, lo que indicaría que la funcionalidad de la nitrato reductasa no se ve comprometida la ausencia de MtMOT1.2

Por el contrario, cuando plantas *mot1.2-1* se inocularon con *S. meliloti* y crecieron sin el aporte de nitrato o amonio se observó una gran disminución del crecimiento y de la biomasa. Esto podría deberse a la reducción de la FSN, ya que se detectó una caída de casi el 80% en la actividad de la nitrogenasa. Es posible relacionar esta reducción con la disminución en el contenido de molibdeno de los nódulos mutantes en comparación con los nódulos silvestres. Unido a este también se apreció un aumento en el contenido de molibdeno en la parte aérea de las plantas *mot1.2-1* que encajaría con una redistribución de ese metal a los otros órganos sumideros. Al reintroducir el gen silvestre en los mutantes *mot1.2-1* el contenido de molibdeno en nódulos aumentó nuevamente, así como la actividad nitrogenasa, la biomasa y el crecimiento, recuperando las plantas mutantes el fenotipo silvestre. Estos dato, junto con la localización del transportador, indicarían que MtMOT1.2 está mediando la carga de molibdeno desde los vasos al nódulo.

Las plantas de la línea *mot1.3-1* mostraron una disminución de la biomasa y de la actividad de la nitrogenasa similar a la descrita en el caso de la línea *mot1.2-1*. No obstante, en el caso de las plantas *mot1.3-1* el contenido en molibdeno de los nódulos mutantes era significativamente mayor que el de los nódulos de plantas silvestres. Este tipo de acumulación de metal ya había

sido reportado previamente por Senovilla et al. (2017) y Abreu et al. (2017) para otros metales también necesarios para la FSN como el cobre y el zinc (Ibrikci & T. Moraghan, 1993; Seliga, 1993). En dichos trabajo se muestra que plantas de *M. truncatula* que no expresan el transportador de cobre MtCOPT1, o el transportador de zinc MtZIP6, ambos localizados en la membrana plasmática de las células infectadas de los nódulos, presentan acumulación de cobre o zinc, respectivamente, en los nódulos. Esta acumulación podría deberse a que la célula envíe señales que activen alguna ruta de respuesta de déficit de metal y de esta manera se incrementara su asimilación y transporte hacia los nódulos. Al igual que ocurría con la línea *mot1.2-1* al reintroducir el gen silvestre el fenotipo observado en los mutantes se restauró, mostrando las plantas complementadas un fenotipo semejante al de las control.

Cabe destacar que los fenotipos observados en ambas líneas mutantes (*mot1.2-1* y *mot1.3-1*) también fueron recuperados al suplementar dichas plantas con concentraciones mayores de molibdeno. Respecto a este hecho se pueden plantear tres posibles explicaciones no excluyentes entre sí. Una posibilidad es que uno de los cinco miembros de la familia MOT1, de la que todos presentan expresión en nódulo, esté compensando la ausencia de MtMOT1.2 o MtMOT1.3. Sin embargo cuando se analizó la expresión de los distintos miembros de la familia MOT1 en el mutante *mot1.3-1* no se vió que ninguno de ellos se sobreexpresara. Otra sería que el molibdeno esté siendo transportado por transportadores de otra familia, como podrían ser miembros de la familia MOT2 que ha sido descrita en *C. reinhardtii* (Tejada-Jiménez, 2011) y que presenta ortólogos en *M. truncatula*, aunque de acuerdo a la base de datos Symbimics (Roux et al, 2014) ninguno de ellos se expresa en los nódulos. Tampoco puede descartarse la existencia de algún transportador de molibdato perteneciente a una familia no identificada hasta la fecha. Finalmente el transporte de molibdeno podría estar siendo realizado de manera inespecífica por transportadores de sulfato como ocurre en SHST1 de la leguminosa *S. hamata*, que ve inhibido el transporte de sulfato cuando se incrementa la concentración de molibdato en el medio (Fitzpatrick, 2008).

Además de las diferencias en el contenido de molibdeno en los nódulos de plantas mutantes también se observó una reducción del tamaño de los mismos en comparación con los de plantas silvestres. Este fenotipo podría indicar que existe algún mecanismo de regulación del desarrollo del nódulo dependiente del estado nutricional de molibdeno. La dependencia de metales como el hierro durante el proceso de desarrollo de los nódulos ya fue reportado por Tang et al. (1991). En ambas líneas mutantes se observó que, salvo en el tamaño, el número de estos nódulos no variaba significativamente con respecto al que se desarrollaba en plantas control. Esto indicaría el que estado nutricional de molibdeno está desacoplado de la producción de nódulos, lo que contrasta con otros trabajos en los que la reducción de la tasa de fijación de nitrógeno es compensada con un mayor numero de nódulos (León-Mediavilla et al., 2018, Takanashi et al., 2013)

Asimismo, estos nódulos de menor tamaño no presentan alteraciones morfológicas evidentes, lo que descarta que el desarrollo de los nódulos esté afectado. Tampoco está afectado el momento de inicio de la nodulación ni la cinética de la misma. Este efecto del Mo en el desarrollo del nódulo abre la pregunta de cómo el esta nutricional de este órgano regula su desarrollo.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones en esta Tesis Doctoral hemos identificado por primera vez dos transportadores de leguminosas implicados en la distribución de molibdeno a nódulos indeterminados. Estos transportadores representan dos pasos más dentro del modelo de transporte de molibdeno al interior de los nódulos mostrado en la figura 33. Este proceso comenzaría con la asimilación del molibdato presente en el suelo a través de la raíz. LjMOT1 (Duan et al., 2017) podría ser uno de los transportadores implicados en este proceso, pero debido a su baja afinidad por el sustrato parece más que probable que existan otros sistemas de transporte de mayor afinidad que participen en este paso. Dentro de los 5 miembros de la familia MOT1 presentes en *M. truncatula* MtMOT1 es quien presenta una mayor homología en su secuencia a LjMOT1 así que es posible hipotetizar que este sea su homólogo en *Medicago*. Una vez cruzada la epidermis de la raíz el molibdeno viajaría hasta el haz vascular por vía simplástica o apoplástica, para entrar en la endodermis de la raíz vía MtMOT1.2. Desde allí el molibdato se cargaría a los vasos a través de los cuales sería transportado a los nódulos. La mayoría de metales como el hierro, el cobre o el zinc viajan por la vasculatura de la planta complejados con diferentes moléculas orgánicas como la nicotianamina (NA), ácido deoximugénico (DMA), citrato, aminoácidos como la histidina, etc. (Irtelli et al., 2009, Küpper et al., 2004, Ando et al., 2013). Se han detectado complejos de molibdato- citrato y molibdato-malato en el xilema de *Pisum sativum* y en complejos molibdato-malato en hojas de *Medicago sativa* hiperacumuladoras de molibdato, lo que parece indicar que estos ácidos orgánicos son los responsables de complejar este metal en plantas (Steinke et al., 2008, Flis et al., 2016). El molibdato se incorporaría a las células infectadas y no infectadas gracias a la acción de MtMOT1.3. Una vez en el interior de las células infectadas este elemento todavía debería cruzar la membrana del simbiosoma de origen vegetal y las membranas del bacteroide. Se desconoce qué transportador media el paso a través de la membrana del simbiosoma, aunque no es de suponer pertenezca a la familia MOT1 ya que este transporte se produce en dirección contraria y se desconocen transportadores de eflujo de molibdeno. Una posible opción son los transportadores de sulfato como SST1, que presenta localización en la membrana del simbiosoma (Krusell et al., 2005).

Figura 33. Modelo propuesto para el transporte de molibdato desde la raíz hasta las células infectadas y no infectadas de los nódulos. MtMOT1.2 (azul) mediaría la entrada de molibdeno a las células de la endodermis de los vasos de la raíz y el nódulo. MtMOT1.3 (rojo) permitiría la entrada de molibdato a las células infectadas y no infectadas de nódulo.

Como puede observarse en la figura 33 todavía quedan incógnitas por resolver dentro del proceso de transporte de molibdeno a los nódulos de leguminosas. Por ejemplo se desconoce la existencia de otro sistema de transporte de molibdeno de mayor afinidad que medie la asimilación de molibdato a través de la raíz. Todavía no ha sido identificado ningún transportador que saque molibdato del interior celular para introducirlo a orgánulos/simbiosoma o liberarlo al

citosol. En lo referente a la homeostasis del molibdeno no se ha identificado como ni donde ni si se produce el almacenamiento de molibdeno dentro de las células, ni que proteínas, pudieran estar implicadas.

CONCLUSIONES

1. MtMOT1.2 y MtMOT1.3 son miembros de la familia MOT1 y presentan la capacidad de transportar molibdato al interior celular con una afinidad de 378,5 nM y 488 nM de molibdato respectivamente.
2. MtMOT1.3 se expresa específicamente en nódulos y se localiza en la membrana plasmática de las células infectadas y no infectadas de la interzona y zona de fijación temprana.
3. MtMOT1.3 es responsable de la entrada de molibdeno a las células infectadas para la FSN
4. MtMOT1.2 se expresa en la endodermis de la raíz y los vasos de los nódulos y localizado en la membrana plasmática y el retículo endoplasmático de estas células.
5. MtMOT1.2 media el transporte de molibdato desde el apoplasto de la raíz al interior de los vasos de la misma y de los vasos al interior de las células de la endodermis de los vasos del nódulo.
6. MtMOT1.2 no está implicado en la distribución de molibdato a otros órganos de la planta distintos del nódulo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 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*, 40(11), pp. 2706-2719.
- Agorio, A., Giraudat, J., Bianchi, M. W., Marion, J., Espagne, C., Castaings, L., Lelievre, F., Curie, C., Thomine, S. & Merlot, S. (2017) 'Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein AtPH1 controls the localization of the metal transporter NRAMP1 in *Arabidopsis*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(16), pp. E3354-e3363.
- Alhendawi, R. A., Kirkby, E. A. & Pilbeam, D. J. (2005) 'Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants', *J Plant Nutr*, 28(8), pp. 1347-1353.
- 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.
- Amanullah, Iqbal, A., Ali, A., Fahad, S. & Parmar, B. (2016) 'Nitrogen source and rate management improve maize productivity of smallholders under semiarid climates', *Front Plant Sci*, 7, pp. 1773.
- Ando, Y., Nagata, S., Yanagisawa, S. & Yoneyama, T. (2013) Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): The effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds. *Funct Plant Bio* 40(1):89-95.
- 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.
- Appleby, C. A. (1984) 'Leghemoglobin and rhizobium respiration', *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), pp. 443-478.
- Ausubel, F. M. (1995) Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 3rd edn. (1 vols). New York: Wiley.
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J. & Vert, G. (2011) 'Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), pp. E450-8.
- 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.
- Benemann, J. R. & Valentine, R. C. (1972) 'The pathways of nitrogen fixation', in Rose, A.H. & Tempest, D.W. (eds.) *Adv Microb Physiol*: Academic Press, pp. 59-104.
- Beringer, J. E. (1974) 'R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*', *J Gen Microbiol*, 84(1), pp. 188-98.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G. T., Grande, A., Yang, H., Dodani, S. C., Pellegrini, M., Huijser, P., Connolly, E. L., Merchant, S. S. & Krämer, U. (2012) 'Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 24(2), pp. 738-61.

- 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. 735-45.
- Bernard, S. M. & Habash, D. Z. (2009) 'The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling', *New Phytol*, 182(3), pp. 608-20.
- Bertani, G. (1951) 'Studies on lysogenesis I.: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* I', *J Bacteriol*, 62(3), pp. 293.
- Billy, F., George Barker, D., Gallusci, P. & Truchet, G. (1991) Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa. *Plant J*, , pp. 27-35.
- 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.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Brewin, N., R. & Hirsch, A. (2004) Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *Crit Rev Plant Sci* 23(4), pp. 293-316.
- Brewin, N. J. (1991) 'Development of the legume root nodule', *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 7(1), pp. 191-226.
- Brito, B., Palacios, J. M., Hidalgo, E., Imperial, J. & Ruiz-Argueso, 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.
- Burén, S. & Rubio, L. M. (2018) 'State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering', *FEMS Microbiol Lett.*, 365(2), pp. 274-274
- Campbell, W. H. (1999) 'Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, pp. 277-303.
- Castro, P. H., Lilay, G. H. & Assunção, A. G. L. (2018) 'Chapter 1 - Regulation of micronutrient homeostasis and deficiency response in plants', in Hossain, M.A., Kamiya, T., Burritt, D.J., Phan Tran, L.-S. & Fujiwara, T. (eds.) *Plant Micronutrient Use Efficiency*: Academic Press, pp. 1-15.
- Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E. & Llamas, A. (2011) 'The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme crARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue', *Eukaryot Cell*, 10(10), pp. 1270-82.
- Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G. & Boivin-Masson, C. (2003) 'Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in Nature', *J Bacteriol*, 185(24), pp. 7266-7272.
- Cheng, G., Karunakaran, R., East, A. K. & Poole, P. S. (2016) 'Multiplicity of sulfate and molybdate transporters and their role in nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae Rlv3841', *Mol Plant Microbe Interact*, 29(2), pp. 143-52.
- 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.

- Curie, C. & Briat, J. F. (2003) 'Iron transport and signaling in plants', *Annu Rev Plant Biol*, 54, pp. 183-206.
- Davidson, A. L. & Chen, J. (2004) 'ATP-binding cassette transporters in bacteria', *Annu Rev Biochem*, 73, pp. 241-68.
- Dazzo, F. (1982) Leguminous root nodules. *Exp Micro Ecol*, pp. 431-446.
- 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', *Microbiol*, 152(Pt 1), pp. 199-207.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. & Kim, C. H. (1987) 'The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated', *J Bacteriol*, 169(7), pp. 3217-23.
- Dos Santos, P. C., Dean, D. R., Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2004) 'Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor', *Chem Rev*, 104(2), pp. 1159-1174.
- Duan, G., Hakoyama, T., Kamiya, T., Miwa, H., Lombardo, F., Sato, S., Tabata, S., Chen, Z., Watanabe, T., Shinano, T. & Fujiwara, T. (2017) 'LjMOT1, a high-affinity molybdate transporter from *Lotus japonicus*, is essential for molybdate uptake, but not for the delivery to nodules', *Plant J*, 90(6), pp. 1108-1119.
- Dénarié, J., Debellé, F. & Rosenberg, C. (1992) 'Signaling and host range variation in nodulation', *Annu Rev Microbiol*, 46, pp. 497-531.
- 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.
- Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z. & Winiwarter, W. (2008) 'How a century of ammonia synthesis changed the world', *Nature Geoscience*, 1, pp. 636.
- Fay, P. (1992) 'Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria', *Microbiol Rev*, 56(2), pp. 340-73.
- Fitzpatrick, K. L., Tyerman, S. D. & Kaiser, B. N. (2008) 'Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1', *FEBS Lett*, 582(10), pp. 1508-1513.
- 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., Pyle, J. A., Raven, J. A. & Sutton, M. A. (2013) 'The global nitrogen cycle in the twenty-first century: introduction', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1621), pp. 20130165.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. & Batut, J. (2001) 'The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium*

- meliloti*', *Science*, 293(5530), pp. 668-72.
- Garg, N. & Renseigné, N. (2007) 'Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review', *Agron. Sustain. Dev*, 27(1), pp. 59-68.
- Gasber, A., Klaumann, S., Trentmann, O., Trampczynska, A., Clemens, S., Schneider, S., Sauer, N., Feifer, I., Bittner, F., Mendel, R. R. & Neuhaus, H. E. (2011) 'Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate', *Plant Biol (Stuttg)*, 13(5), pp. 710-8.
- 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., Saéz, Á. & Tejada-Jiménez, M. (2016) 'Transition Metal Transport in Plants and Associated Endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia', *Front Plant Sci*, 7, pp. 1088.
- Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003) 'Legumes: importance and constraints to greater use', *Plant Physiol*, 131(3), pp. 872-7.
- Grewal, H. S. (2001) 'Zinc influences nodulation, disease severity, leaf drop and herbage yield of alfalfa cultivars', *Plant Soil*, 234(1), pp. 47-59.
- 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.
- Grunden, A. M. & Shanmugam, K. T. (1997) 'Molybdate transport and regulation in bacteria', *Arch Microbiol*, 168(5), pp. 345-54.
- Guinel, F. C. (2009) 'Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types', *Botany*, 87(12), pp. 1117-1138.
- 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.
- Halbleib, C. M. & Ludden, P. W. (2000) 'Regulation of biological nitrogen fixation', *J Nutr*, 130(5), pp. 1081-4.
- Hanahan, D. (1983) 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *J Mol Biol*, 166(4), pp. 557-80.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. & Burns, R. C. (1968) 'The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation', *Plant Physiol*, 43(8), pp. 1185-207.
- Hennecke, H., Kaluza, K., Thöny, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W. & Stackerbrandt, E. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch Microbiol*, 142, pp. 342.
- Hernandez, J. A., George, S. J. & Rubio, L. M. (2009) 'Molybdenum trafficking for nitrogen fixation', *Biochemistry*, 48(41), pp. 9711-21.
- Hesberg, C., Hänsch, R., Mendel, R. R. & Bittner, F. (2004) 'Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities', *J Biol Chem*, 279(14), pp. 13547-54.
- Hibara, K.-I., Hosoki, W., Hakoyama, T., Ohmori, Y., Fujiwara, T., Itoh, J.-I. & Nagato, Y. (2013) 'Abnormal Shoot In Youth, a Homolog of Molybdate Transporter Gene, Regulates Early

- Shoot Development in Rice', *AJPS* 4(5), pp. 9.
- Hill, R. D., Rinker, R. G. & Wilson, H. D. (1980) 'Atmospheric nitrogen fixation by lightning', *J. Atmospheric Sci*, 37(1), pp. 179-192.
- 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.
- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z. Y., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. (2014) 'Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage', *Chem Rev*, 114(8), pp. 4041-62.
- Hoffmann, S. K., Goslar, J., Lijewski, S., Basinski, K., Gasowska, A. & Lomozik, L. (2012) 'EPR and potentiometric studies of copper(II) binding to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in water solution', *J Inorg Biochem*, 111, pp. 18-24.
- Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2013) 'Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase', *J Biol Chem*, 288(19), pp. 13173-7.
- Hänsch, R., Lang, C., Rennenberg, H. & Mendel, R. R. (2007) 'Significance of plant sulfite oxidase', *Plant Biol (Stuttg)*, 9(5), pp. 589-95.
- Hänsch, 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.
- Ibrikci, H. & T. Moraghan, J. (1993) 'Differential responses of soybean and dry bean to zinc deficiency', *J Plant Nutr*, 16(9):1791-1805
- Irtelli, B., Petrucci, W. A. & Navari-Izzo, F. (2009) 'Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess', *J Exp Bot*, 60(1), pp. 269-77.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H. & Nishizawa, N. K. (2012) 'Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport', *Sci Rep*, 2, pp. 286.
- 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.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inzé, 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.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000) 'Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*', *DNA Res*, 7(6), pp. 331-8.
- Kant, S., Bi, Y. M. & Rothstein, S. J. (2011) 'Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency', *J Exp Bot*, 62(4), pp. 1499-509.
- Kielland, K. (1994) 'Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling', *Ecology*, 75(8), pp. 2373-2383.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C. & Maier, U. G. (2007) 'Nitrogen fixation in eukaryotes: new models for symbiosis', *BMC Evol Biol*, 7, pp. 55.
- Kobayashi, T. & Nishizawa, N. K. (2012) 'Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants', *Annu Rev Plant Biol*, 63, pp. 131-52.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. & Sato, M. (1996) 'Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize', *Plant*

- Physiol*, 110(3), pp. 781-789.
- Krusell, L., Krause, K., Ott, T., Desbrosses, G., Krämer, U., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., James, E. K., Sandal, N., Stougaard, J., Kawaguchi, M., Miyamoto, A., Suganuma, N. & 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.
- Küpper, H., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W. & Kroneck, P. M. H. (2004) 'Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) revealed by X-Ray absorption spectroscopy', *Plant Physiol*, 134(2), pp. 748.
- Ladha, J. K., Pathak, H., J. Krupnik, T., Six, J. & van Kessel, C. (2005) 'Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects', *Adv Agro: Academic Press*, pp. 85-156.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227.
- Larrainzar, E., Wienkoop, S., Weckwerth, W., Ladrera, R., Arrese-Igor, C. & González, E. M. (2007) '*Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress', *Plant Physiol*, 144(3), pp. 1495-507.
- Lee, J. H., Wendt, J. C. & Shanmugam, K. T. (1990) 'Identification of a new gene, *molR*, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 172(4), pp. 2079-87.
- Leghari, S. J., Ahmed Wahocho, N., Laghari, G., Laghari, A., Mustafa Bhabhan, G., Hussain Talpur, K., Ahmed Bhutto, T., Ali Wahocho, S. & Lashari, A. (2016) Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A review. *AEB*, 10(9), pp.209-218.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Mailliet, 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. & Gueriot, M. L. (1996) 'Iron Uptake by Symbiosomes from Soybean Root Nodules', *Plant Physiol*, 111(3), pp. 893-900.
- León-Mediavilla, J., Senovilla, M., Montiel, J., Gil-Díez, P., Saez, Á., Kryvoruchko, I. S., Reguera, M., Udvardi, M. K., Imperial, J. & González-Guerrero, M. (2018) 'MtMTP2-Facilitated Zinc Transport Into Intracellular Compartments Is Essential for Nodule Development in', *Front Plant Sci*, 9, pp. 990.
- Li, F. W., Brouwer, P., Carretero-Paulet, L., Cheng, S., de Vries, J., Delaux, P. M., Eily, A., Koppers, N., Kuo, L. Y., Li, Z., Simenc, M., Small, I., Wafula, E., Angarita, S., Barker, M. S., Bräutigam, A., dePamphilis, C., Gould, S., Hosmani, P. S., Huang, Y. M., Huettel, B., Kato, Y., Liu, X., Maere, S., McDowell, R., Mueller, L. A., Nierop, K. G. J., Rensing, S. A., Robison, T., Rothfels, C. J., Sigel, E. M., Song, Y., Timilsena, P. R., Van de Peer, Y., Wang, H., Wilhelmsson, P. K. I., Wolf, P. G., Xu, X., Der, J. P., Schluepmann, H., Wong, G. K. & Pryer, K. M. (2018) 'Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses', *Nat Plants*, 4(7), pp. 460-472.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25(4), pp. 402-8.
- Lodwig, E. & Poole, P. (2003) 'Metabolism of rhizobium bacteroids', *Crit Rev Plant Sci*, 22(1), pp. 37-78.
- Maathuis, F. J. (2009) 'Physiological functions of mineral macronutrients', *Curr Opin Plant Biol*, 12(3), pp. 250-8.

- Maathuis, F. J. & Diatloff, E. (2013) 'Roles and functions of plant mineral nutrients', *Methods Mol Biol*, 953, pp. 1-21.
- MacLean, A. M., Finan, T. M. & Sadowsky, M. J. (2007) 'Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes', *Plant Physiol*, 144(2), pp. 615-22.
- MacLeod, J. A., Gupta, U. C. & Stanfield, B. (1997) 'Molybdenum and sulfur relationships in plants', in Gupta, U.C. (ed.) *Molybdenum in Agriculture*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 229-244.
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. & Andre, B. (1997) 'A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mol Cell Biol*, 17(8), pp. 4282-93.
- Maróti, G. & Kondorosi, E. (2014) 'Nitrogen-fixing rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis?', *Front Microbiol*, 5, pp. 326.
- Maupin-Furlow, J. A., Rosentel, J. K., Lee, J. H., Deppenmeier, U., Gunsalus, R. P. & Shanmugam, K. T. (1995) 'Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 177(17), pp. 4851-6.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982) 'Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis', *J Bacteriol*, 149(1), pp. 114-22.
- Mendel, R. R. & Bittner, F. (2006) 'Cell biology of molybdenum', *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), pp. 621-35.
- Mendel, R. R. & Hansch, R. (2002) 'Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants', *J Exp Bot*, 53(375), pp. 1689-98.
- 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. & Nebenführ, 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.
- Noxon, J. F. (1976) 'Atmospheric nitrogen fixation by lightning', *Geophysi Res Lett*, 3(8), pp. 463-465.
- 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.
- Oldroyd, G. E. D. (2013) 'Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants', *Nat Rev Microbiol*, 11, pp. 252.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. & Udvardi, M. K. (2005) 'Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development', *Curr Biol*, 15(6), pp. 531-5.
- Palmer, C. M. and Guerinot, M. L. (2009) 'Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants', *Nat Chem Biol*, 5(5), pp. 333-40.
- Pate, J. S., Gunning, B. E. & Briarty, L. G. (1969) 'Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule', *Planta*, 85(1), pp. 11-34.
- Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S. & Iaccarino, M. (2004) 'Organogenesis of legume root nodules', *Int Rev Cytol*, 234, pp. 201-62.
- 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.

- Pilon, M., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Gogolin, K. A. & Ye, H. (2006) 'Copper cofactor delivery in plant cells', *Curr Opin Plant Biol*, 9(3), pp. 256-63.
- Popp, C. & Ott, T. (2011) 'Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis', *Curr Opin Plant Biol*, 14(4), pp. 458-67.
- 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., Thöny-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.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. (2003) 'Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases', *Nature*, 425(6958), pp. 585-92.
- Raun, W. R. & Johnson, G. V. (1999) 'Improving nitrogen use efficiency for cereal production', *Agron J*, 91(3), pp. 357-363.
- Ray, J. D., Heatherly, L. G. & Fritsch, F. B. (2006) 'Influence of large amounts of nitrogen on nonirrigated and irrigated soybean mention of a trademark or proprietary product does not constitute a guarantee or warranty of the product by the U.S. Department of Agriculture and does not imply approval or the exclusion of other products that may also be suitable', *Crop Science*, 46(1), pp. 52-60.
- Reddy, K. J. & Gloss, S. P. 1993. Geochemical speciation as related to the mobility of F, Mo and Se in soil *Appl. Geochem.* 23(4), pp. 156-234.
- 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.
- 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.
- Rosentel, J. K., Healy, F., Maupin-Furlow, J. A., Lee, J. H. & Shanmugam, K. T. (1995) 'Molybdate and regulation of *mod* (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 177(17), pp. 4857-64.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, 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, L. M. & Ludden, P. W. (2005) 'Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle', *J Bacteriol*, 187(2), pp. 405-14.
- Rubio, L. M. & Ludden, P. W. (2008) 'Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase', *Ann Rev Microbiol*, 62(1), pp. 93-111.
- 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.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006) 'Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride', *CSH Protoc*, 2006(1).

- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. J. & Peñarrubia, L. (2004) 'The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development', *J Biol Chem*, 279(15), pp. 15348-55.
- 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.
- Scheible, W. R., González-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schulze, E. D. & Stitt, M. (1997) 'Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase', *Planta*, 203(3), pp. 304-19.
- 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.
- Schwarz, G., Mendel, R. R. & Ribbe, M. W. (2009) 'Molybdenum cofactors, enzymes and pathways', *Nature*, 460(7257), pp. 839-47.
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M. & Dean, D. R. (2009) 'Mechanism of Mo-dependent nitrogenase', *Annu Rev Biochem*, 78, pp. 701-22.
- Self, W. T., Grunden, A. M., Hasona, A. & Shanmugam, K. T. (2001) 'Molybdate transport', *Res Microbiol*, 152(3-4), pp. 311-21.
- Senovilla, M., Castro-Rodriguez, R., Abreu, I., Escudero, V., Kryvoruchko, I. S., Udvardi, M., Imperial, J. & Gonzalez-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* copper transporter1 (MtCOPT1) delivers copper for symbiotic nitrogen fixation', *New Phytol.*;218(2):696-709.
- Seo, M. & Koshiba, T. (2002) 'Complex regulation of ABA biosynthesis in plants', *Trends Plant Sci*, 7(1), pp. 41-8.
- Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1981) *Methods in yeast genetics: laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York.
- Sickerman, N. S., Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2017) 'Nitrogenase assembly: strategies and procedures', *Methods Enzymol*, 595, pp. 261-302.
- Sinclair, S. A. & Krämer, U. (2012) 'The zinc homeostasis network of land plants', *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), pp. 1553-67.
- Steinke, D. R., Majak, W., Sorensen, T. S. & Parvez, M. (2008) 'Chelation of molybdenum in *Medicago sativa* (alfalfa) grown on reclaimed mine tailings', *J Agric Food Chem*, 56(13), pp. 5437-42.
- Strandberg, G. W. & Wilson, P. W. (1968) 'Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*', *Can J Microbiol*, 14(1), pp. 25-31.
- 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.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S. & Fujiwara, T. (2010) 'Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11), pp. 5220-5.
- 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.
- Tang, C., Robson, A. D., Dilworth, M. J. & Kuo, J. (1992) 'Microscopic evidence on how iron deficiency limits nodule initiation in *Lupinus angustifolius* L', *New Phytol*, 121(3), pp. 457-467.
- Tejada-Jimenez, M., Galvan, A. & Fernandez, E. (2011) 'Algae and humans share a molybdate transporter', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(16), pp. 6420-5.
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Lucas, M. M., Udvardi, M., Imperial, J. & González-Guerrero, M. (2015) '*Medicago truncatula* natural resistance-associated macrophage Protein1 is required for iron uptake by rhizobia-infected nodule cells', *Plant Physiol*, 168(1), pp. 258-72.
- Tejada-Jiménez, M., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A. and Fernandez, E. (2018) 'Chapter 8 - Roles of Molybdenum in Plants and Improvement of Its Acquisition and Use Efficiency', in Hossain, M.A., Kamiya, T., Burritt, D.J., Phan Tran, L.-S. & Fujiwara, T. (eds.) *Plant Micronutrient Use Efficiency*: Academic Press, pp. 137-159.
- 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. E., Soerensen, K. U., Von Jolley, D. & Brown, J. C. 1991. The role of active *Bradyrhizobium japonicum* in iron stress response of soybeans. Springer, Dordrecht ed. Iron Nutrition and Interactions in Plants.
- 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.
- Triplett, E. W. (1985) 'Intercellular nodule localization and nodule specificity of xanthine dehydrogenase in soybean', *Plant Physiol*, 77(4), pp. 1004-9.
- Udvardi, M. & Poole, P. S. (2013) 'Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses', *Ann Rev Plant Biol*, 64(1), pp. 781-805.
- 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', *Mol Plant Micro Interact*, 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.
- White, J., Prell, J., James, E. K. & Poole, P. (2007) 'Nutrient sharing between symbionts', *Plant Physiol*, 144(2), pp. 604-14.
- 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.
- Wittenberg, J. B. (1974) 'Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules', *J Biol Chem*, 249(13), pp. 4057-66.

- Wood, S. & Cowie, A. (2004) A Review of Greenhouse Gas Emission Factors for Fertiliser Production. A review of greenhouse gas emission factors for fertiliser production, IEA Bioenergy Task 38, 1, 1, pp. 1-20. (2004) [Government or Industry Research]
- 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.
- Xin, C., Qing-wei, Y., Jia-lin, S., Shuang, X., Fu-chun, X. & Ya-jun, C. (2014) 'Research progress on nitrogen use and plant growth', *J. Northeast Agric (English Edition)*, 21(2), pp. 68-74.
- Xuan, W., Beeckman, T. & Xu, G. (2017) 'Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling', *Curr Opin Plant Biol*, 39, pp. 57-65.
- Zhang, P., Ma, G., Wang, C., Lu, H., Li, S., Xie, Y., Ma, D., Zhu, Y. & Guo, T. (2017) 'Effect of irrigation and nitrogen application on grain amino acid composition and protein quality in winter wheat', *PLoS One*, 12(6), pp. e0178494.
- Zhu, H., Choi, H. K., Cook, D. R. & Shoemaker, R. C. (2005) 'Bridging model and crop legumes through comparative genomics', *Plant Physiol*, 137(4), pp. 1189-96.
- Zipfel, C. & Oldroyd, G. E. (2017) 'Plant signalling in symbiosis and immunity', *Nature*, 543(7645), pp. 328-336.
- Čorić, I. & Holland, P. L. (2016) 'Insight into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from synthetic iron complexes with sulfur, carbon, and hydride Ligands', *J Am Chem Soc*, 138(23), pp. 7200-11.