UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas

Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal

Papel de *MtMTP2* y *MtATX1* en el tráfico intracelular de metales en nódulos de *Medicago truncatula*

TESIS DOCTORAL

Javier León Mediavilla

Graduado 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:

**“Papel de *MtMTP2* y *MtATX1* en el tráfico intracelular de metales
en nódulos de *Medicago truncatula*”**

Autor:

Javier León Mediavilla

Graduado en Biología

Director:

Manuel González-Guerrero

Licenciado en Bioquímica

Doctor en Bioquímica

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras	v
Lista de tablas.....	vii
Abreviaturas	xi
Resumen/abstract.....	xvii
 Introducción	 1
1. Fijación Simbiótica de Nitrógeno en leguminosas	4
2. Homeostasis de metales en fijación simbiótica de nitrógeno	6
2.1 Metales de transición: desde la rizosfera al nódulo	7
2.2 Descarga de metales en nódulos y su movilización hasta las células de nódulo.....	8
2.3 Tráfico intracelular de metales en las células infectadas de nódulo	10
2.3.1 Transportadores. Distribuyendo a los compartimentos celulares	10
2.3.2 Metalochaperonas: Distribuyendo el metal mediante interacción proteína-proteína ...	13
Objetivos	19
Materiales y Métodos.....	23
1. Material biológico y condiciones de crecimiento	25
1.1. <i>Medicago truncatula</i>	25
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.3. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	26
1.4. <i>Escherichia coli</i>	26
1.5. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	27
2. Medios de cultivo y solución de riego.....	27
2.1 Medios y soluciones de plantas	27
2.1.1 Medio Fahreaus	27
2.1.1. Solución Jenner	27
2.2. Medios y soluciones de levaduras	28
2.2.1. Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)	28
2.2.2. Yeast Extract-Ethanol-Glycerol (YPEG).....	28
2.2.3. Synthetic Dextrose (SD).....	28
2.3. Medios y soluciones de bacteria.....	28
2.3.1. Tryptone Yeast (TY)	28
2.3.2. Yeast Mannitol Broth (YMB).....	29
2.3.3. Lysogeny Broth (LB).....	29
2.3.4. Super Optimal broth with Catabolic repressor (SOC).....	29
2.3.5. Terrific Broth (TB).....	30
2.3.6. 2x Yeast Triptone (2xYT).....	30
3. Extracción de ácidos nucleicos de <i>M. truncatula</i>.....	30
3.1. Extracción de ADN para genotipado de mutantes de <i>M. truncatula</i>	30

3.2. Extracción de ADN genómico de plantas.....	31
3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras	32
3.5. Extracción de ARN en plantas.....	33
3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	34
3.7. Electroforésis de ácidos nucleicos.....	35
3.8. Electroforésis para la visualización de ARN	35
4. Síntesis de ADN complementario	36
5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	36
5.1. PCR para la amplificación de fragmentos (no cuantitativa).....	36
5.1.2. PCR para la comprobación de fragmentos	37
5.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	38
5.3. Oligonucleótidos.....	39
6. Clonación	41
6.1. Vectores usados.....	41
6.3. Clonación por recombinación homóloga.....	42
7. Transformación	42
7.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	42
7.1.1. Preparación de células quimiocompetentes.....	42
7.1.2. Transformación de células quimiocompetentes.....	43
7.1.3. Preparación de células electrocompetentes	43
7.1.4. Transformación de células electrocompetentes	44
7.2. Transformación de <i>A. rhizogenes</i>	44
7.2.1. Preparación de células electrocompetentes	44
7.2.2. Transformación de células electrocompetentes	45
7.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	45
7.4. Transformación de <i>M. truncatula</i>	46
8. Detección y visualización de la actividad β-glucuronidasa (GUS).....	46
9. Microscopía de campo claro	47
10. Microscopía confocal	48
10.1. Fijación, inclusión y corte de muestras	48
10.2. Inmunohistoquímica de muestras para confocal	48
10.3. Observación y obtención de imágenes con microscopio confocal	49
11. Microscopía electrónica de Transmisión (MET).....	49
11.2. Corte de muestras para microscopía electrónica	50
11.3. Inmunohistoquímica de muestras para MET	51
11.4. Observación y captura de imágenes en MET	51
12. Determinación de contenido de metales	51
13. Medida de la actividad nitrogenasa	51
14. Determinación de la formación de unidades de colonia.....	52
15. Inducción, detección y purificación de proteínas.....	52
15.1. Inducción de la expresión de proteínas en cultivos de <i>E. coli</i>	52
15.2. Detección de proteínas por Western blot	53

15.2.1. Electroforésis de proteínas y tinción del gel.....	53
15.2.2. Electrotransferencia de proteínas	53
15.2.3. Inmunodetección de proteínas.....	54
15.3. Purificación de proteínas	54
15.4. Cuantificación de proteínas mediante Bradford	55
17. Bioinformática.....	56
17.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.....	56
17.2. Representación tridimensional de estructuras protéicas.....	59
17.3. Diseño de oligonucleótidos	60
17.4. Análisis estadísticos.....	60
Resultados.....	63
<i>MtMTP2</i>	65
1. <i>MtMTP2</i>	67
1.1. <i>MtMTP2</i> presenta un máximo de expresión en nódulo	67
1.3. <i>MtMTP2</i> complementa una cepa mutante deficiente en la detoxificación de zinc	70
1.4. La expresión de <i>MtMTP2</i> se distribuye desde la zona de infección y diferenciación hasta la fijación de nódulo.....	72
1.5. <i>MtMTP2</i> localiza en endomembranas en células de nódulo	72
1.6. <i>MtMTP2</i> se localiza en retículo endoplasmático en células de nódulo de <i>M. truncatula</i> ..	74
1.7. <i>MtMTP2</i> se requiere para el desarrollo del nódulo	76
1.8. La ausencia de <i>MtMTP2</i> altera el desarrollo de nódulos y bacteroides.....	81
<i>MtATX1</i>	85
2. <i>MtATX1</i>	87
2.1. Análisis de las secuencias de las putativas metalo-chaperonas	87
2.2. <i>MtATX1</i> se expresa específicamente en nódulos	89
2.3. Estructura terciaria de <i>MtATX1</i>	89
2.4. <i>MtATX1</i> es una Cu ⁺ -chaperona.....	90
2.5. La expresión de <i>MtATX1</i> localiza desde la zona II a la zona III de nódulo	92
2.6. <i>MtATX1</i> localiza en células infectadas y no infectadas de nódulo	93
2.7. Los mutantes de <i>MtATX1</i> no afectan al crecimiento en condiciones no simbióticas	95
2.8. Los mutantes de <i>MtATX1</i> se muestran afectados en condiciones simbióticas	96
Discusión	99
1. <i>MtMTP2</i>	101
2. <i>MtATX1</i>	103
Conclusiones	107
Bibliografía	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un nódulo indeterminado.....	5
Figura 2. Esquema del transporte de metales en el nódulo.....	9
Figura 3. Estructura de una Cu ⁺ -chaperona típica, CopZ de <i>Enterococcus hirae</i> (PDB ID: 1CPZ)	14
Figura 4. Esquema representativo de geotipado.	38
Figura 5. Expresión de la familia MTP en <i>M. truncatula</i> en diferentes órganos.....	68
Figura 6. Dendrograma de miembros de la familia MTP	69
Figura 7. Estructura putativa de MtMTP2 y sus residuos putativos de coordinación de metal.....	70
Figura 8. Ensayo de crecimiento de cepas mutantes de levadura	71
Figura 9. Distribución de la expresión tisular de <i>MtMTP2</i>	72
Figura 10. Localización celular de MtMTP2 en <i>M. truncatula</i>	73
Figura 11. Control de autofluorescencia para la emisión de GFP y Alexa 594.	74
Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión en <i>MtMTP2</i>	75
Figura 13. Fenotipo de los mutantes de <i>MtMTP2</i> cultivados en condiciones no simbióticas	76
Figura 14. Fenotipo de mutantes del gen <i>MtMTP2</i> en condiciones no simbióticas cultivados a distintas concentraciones de zinc	77
Figura 15. Fenotipo de los mutantes del gen <i>MtMTP2</i> en condiciones simbióticas.	78
Figura 16. Fenotipo de las líneas mutantes en el gen <i>MtMTP2</i> con sus segregantes	79
Figura 17. Fenotipo de la línea <i>mtp2-2</i> en condiciones no simbióticas en un gradiente de zinc.	80
Figura 18. Ensayo de desarrollo de nódulos en los mutantes <i>mtp2</i>	82
Figura 19. Desarrollo de nódulo y bacteroides en los mutantes del gen <i>MtMTP2</i>	83
Figura 20. Desarrollo de nódulo y bacteroides en los mutantes del gen <i>MtMTP2</i>	84
Figura 21. Dendrograma de las putativas metalo-chaperonas de <i>M. truncatula</i> y <i>A. thaliana</i>	88
Figura 22. Determinación de la expresión relativa de <i>MtATX1</i>	89
Figura 23. Modelo de la estructura de <i>MtATX1</i>	90
Figura 24. Ensayo de complementación funcional de levaduras con <i>MtATX1</i>	91
Figura 25: Determinación de la afinidad de unión a Cu ⁺ de MtATX1 ₁₋₇₈	92
Figura 26. Distribución de la expresión de <i>MtATX1</i>	93
Figura 27. Localización subcelular de MtATX1 en <i>M. truncatula</i>	94
Figura 28. Control de autofluorescencia para la emisión de Alexa 594	95
Figura 29. Fenotipo de las líneas mutantes del gen <i>MtATX1</i> en condiciones no simbióticas.....	96
Figura 30. Fenotipo de las líneas mutantes del gen <i>MtATX1</i> en condiciones simbióticas.....	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Tabla 2. Cepas de <i>S. meliloti</i>	26
Tabla 3. Condiciones estándar de PCR utilizadas.	37
Tabla 4. Concentraciones de los reactivos usados para PCR.	37
Tabla 5. Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas.	39
Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados	39
Tabla 7. Vectores usados en este trabajo	41
Tabla 8. Secuencias utilizadas para el árbol filogenético de la familia MTP.....	57
Tabla 9. Secuencias utilizadas para el dendrograma de metalochaperonas.	58

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATX	Del inglés “ <i>Antioxidant protein</i> ”
BSA	Del inglés “ <i>Bovine serum albumin</i> ”
bv	Biovar
CCC1	Del inglés “ <i>Ca²⁺ Cross-Complementer 1</i> ”
CCH	Del inglés “ <i>Copper Chaperone</i> ”
CCS	Del inglés “ <i>Copper Chaperone for Superoxide dismutase</i> ”
CDF	Del inglés “ <i>Cation Diffusion Facilitator</i> ”
CNX	Del inglés “ <i>Cofactor for Nitrate reductase and Xanthine dehydrogenase</i> ”
COPT	Del inglés “ <i>Copper Transporter</i> ”
CTAB	Del inglés “ <i>Bromuro de hexadeciltrimetilamonio</i> ”
CTR	Del inglés “ <i>Copper Transporter</i> ”
DAPI	(4',6-diamino-2-fenilindol)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DMT	Del inglés “ <i>Divalent metal transporter</i> ”
dNTPs	Del inglés “ <i>deoxynucleotide triphosphates</i> ”
DO	Densidad Óptica
dpi	días post-inoculación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
FeMoco	Cofactor de hierro-molibdeno
FPN	Ferroportina
FRO	Ferorreductasa oxidasa

Abreviaturas

FSN	Fijación simbiótica de nitrógeno
GFP	Del inglés “ <i>Green Fluorescent Protein</i> ”
Gm	Gentamicina
HMA	Del inglés “ <i>Heavy Metal P-type ATPase</i> ”
ICP-MS	Del inglés “ <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ”
Km	Kanamicina
LB	Del inglés “ <i>Lysogenic Broth</i> ”
MATE	Del inglés “ <i>Multi-Antimicrobial Extrusion protein</i> ”
Moco	Cofactor de molibdeno
MOPs	Del inglés “ <i>3-(N-Morpholino) Propanesulfonic acid</i> ”
MOT1	Del inglés “ <i>Molybdate Transporter 1</i> ”
MTP	Del inglés “ <i>Metal Tolerance Protein</i> ”
NRAMP	Del inglés “ <i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i> ”
OPT	Del inglés “ <i>Oligopeptide transporter</i> ”
p/v	Peso/volumen
PAA	Del inglés “ <i>P-type ATPase of Arabidopsis</i> ”
PBS	Del inglés “ <i>Phosphate-buffered saline</i> ”
PCR	Del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Fluoruro de Metilfenilsulfonio
qRT-PCR	Del inglés “ <i>quantitative-Real Time PCR</i> ”
RAN1	Del inglés “ <i>Responsive to Antagonist 1</i> ”
SD	Del inglés “ <i>Standard Deviation</i> ”
SD	Del inglés “ <i>Synthetic Defined Medium</i> ”
SDS	Del inglés “ <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> ”

SE	Del inglés “ <i>Standard Error</i> ”
SOB	Del inglés “ <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> ”
SOD	Del inglés “ <i>Superoxide Dismutase</i> ”
Str	Estreptomicina
TB	Del inglés “ <i>Terrific Broth</i> ”
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
TY	Del inglés “ <i>Tryptone</i> ”
v/v	volumen/volumen
VIT1	Del inglés “ <i>Vacuolar Iron Transporter 1</i> ”
YMB	Del inglés “ <i>Yeast Mannitol Broth</i> ”
YPD	Del inglés “ <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> ”
YPEG	Del inglés “ <i>Yeast extract Peptone Ethanol Glycerol</i> ”
YSL	Del inglés “ <i>Yellow Stripe-Like transporter</i> ”
ZIP	Del inglés “ <i>Znt-1-like, IRT1-like Protein</i> ”

La fijación simbiótica de nitrógeno es uno de los procesos más importantes del ciclo del nitrógeno para su introducción en los ecosistemas. Una de sus formas mejor estudiadas es la relación establecida entre las leguminosas y bacterias diazotrofas llamadas rizobios. En esta interacción se desarrollan unos nuevos órganos en la raíz, los nódulos, donde la fijación de nitrógeno tiene lugar. Este proceso requiere la acción de diversas metaloproteínas por lo que una correcta homeostasis de metales es esencial para su correcto desarrollo. Esta Tesis Doctoral ha caracterizado dos genes relacionados con la homeostasis de zinc y cobre (*MtMTP2* y *MtATX1*, respectivamente) en nódulos de *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*. *MtMTP2* es un transportador que introduce zinc en el retículo endoplasmático de las células de los mismos. Su ausencia reduce el crecimiento de las plantas cuando estas dependen del nitrógeno fijado en los nódulos, altera el desarrollo de estos y la diferenciación de los bacteroides, lo que lleva a una reducción drástica en la actividad nitrogenasa. *MtATX1* es una Cu⁺-chaperona específica de nódulos que localiza en las células infectadas. Su ausencia reduce a la mitad la actividad nitrogenasa. *MtMTP2* y *MtATX1* son requeridos para un correcto desarrollo de la fijación simbiótica de nitrógeno en *M. truncatula*.

Symbiotic nitrogen fixation is a primary source of assimilable nitrogen in natural ecosystems. The interaction established between legumes and diazotrophic bacteria known as rhizobia is one of the best understood. In this relationship new organs are developed, the root nodules, where symbiotic nitrogen fixation takes place. The process requires relatively large amounts of transition metal as cofactors of many of the enzymes participating in it. In this PhD Thesis, we characterized two genes involved in the *M. truncatula* and *S. meliloti* symbiosis related with zinc and copper homeostasis (*MtMTP2* and *MtATX1*, respectively). *MtMTP2* is nodule-induced Zn-efflux protein that was localized in the endoplasmic reticulum in root epidermal and endodermal cells, as well as in nodule cells. Loss of *MtMTP2* function resulted in altered nodule development and bacteroid differentiation, changes in zinc homeostasis and a severe reduction of nitrogenase activity. *MtATX1* is a nodule-specific Cu⁺-chaperone that is expressed in nodule cells. Its absence reduces plant growth and nitrogenase activity. Both genes are required for effective symbiotic nitrogen fixation in *M. truncatula*.

Introducción

El ciclo global del nitrógeno es central en la biogeoquímica del planeta (Galloway, 2005). Este elemento es uno de los nutrientes esenciales para todos los organismos formando parte, entre otras moléculas, de proteínas y ácidos nucleicos (LeBauer y Treseder, 2008). Sin embargo, la fuente más abundante del nitrógeno de la naturaleza no se halla en forma disponible para la mayoría los organismos al encontrarse como dinitrógeno gaseoso (N_2). Sólo unos pocos seres vivos, llamados diazotrofos, son capaces de reducir el N_2 a amonio (NH_4^+), en un proceso llamado fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Burris y Roberts, 1993). La FBN desplaza grandes flujos de este elemento desde la atmósfera hacia los ecosistemas marinos o terrestres (Isobe y Ohte, 2014). Posteriormente, el nitrógeno fijado puede volver a la atmósfera como N_2 mediante otros microorganismos, los denitrificantes (Zumft, 1997; Zehr y Kudela, 2011).

Algunas bacterias diazotrofas llamadas rizobios han compartido un camino coevolutivo con plantas de la familia *Fabaceae* principalmente, estableciendo una relación endosimbiótica (Remigi *et al.*, 2016; Coba de la Peña *et al.*, 2017). Los rizobios son un grupo parafilético muy diverso, con miembros de los grupos α - y β -proteobacteria que sólo son diazotrofas en simbiosis (Rivas *et al.*, 2009). En esta interacción, la raíz de la planta es colonizada por el rizobio tras un complejo diálogo molecular (Freiberg *et al.*, 1997; Clúa *et al.*, 2018). El nódulo proporciona nitrógeno a la planta en forma de NH_3 y a cambio, la legumbre le proporciona los nutrientes minerales y fotoasimilados necesarios para realizar tal tarea (Udvardi y Day, 1997; Udvardi y Poole, 2013). Este proceso de coevolución se ha venido a llamar simbiogénesis y se define como la aparición de nuevas fisiologías, tejidos, órganos, e incluso especies como consecuencia directa de la simbiosis (Chapman y Margulis, 1998). Como resultado ha proporcionado a la familia de las legumbres la ventaja de poder asentarse eficazmente en suelos deficitarios en nitrógeno (McKey, 1994; Margulis y Chapman, 1998).

Esta Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) no es exclusiva de interacciones rizobio-leguminosa (Santi *et al.*, 2013). Existen en la naturaleza otras como la establecida entre bacterias filamentosas gram-positivas del género *Frankia* y al menos 8 de familias de plantas (Sellstedt y Richau, 2013), entre algunos rizobios y el pequeño género de plantas *Parasponia* (Behm *et al.*, 2014), o incluso en el reino animal han sido descritas procariotas fijadoras de nitrógeno en simbiosis con varios invertebrados como esponjas, corales, erizos de mar o algunos protistas (Fiore *et al.*, 2010). Sin embargo, la relación entre los géneros de rizobio y la familia de leguminosas es la mejor estudiada hasta la fecha.

Así pues, las legumbres introducen mediante esta simbiosis una fracción importante del nitrógeno asimilado en los ecosistemas naturales, en torno a las 260 millones de toneladas anuales (Vitousek *et al.*, 2002; Fowler *et al.*, 2013). Esta capacidad las hace ser una alternativa de gran relevancia frente a los fertilizantes sintéticos (Crews y Peoples, 2004). De este modo, el uso y recuperación de estrategias agronómicas como la rotación de cultivos (Hirsch y Mauchline, 2015), y la casi cosmopolita distribución natural de las legumbres (Smýkal *et al.*, 2015), gracias a su vasta diversidad de géneros, especies, y de los recursos fitogenéticos que eso supone (Peix *et al.*, 2015), hacen de las legumbres herramientas sostenibles de gran potencia para solventar los inconvenientes derivados de la insuficiencia de nitrógeno en suelos cultivables (Hirsch y Mauchline, 2015).

1. Fijación Simbiótica de Nitrógeno en leguminosas

La simbiosis establecida entre rizobios y leguminosas es muy específica y conlleva un complejo intercambio de señales acompañado del desarrollo y establecimiento de nódulos en la raíz. El nódulo se trata de un nuevo órgano originado a partir de la división de células del córtex y periciclo de la raíz (Vessey, 2004; Oldroyd y Downie, 2008). Una de las funciones del nódulo es producir un entorno físico favorable para la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria, reduciendo los niveles de oxígeno libre, el cual limita el funcionamiento de la enzima clave del proceso. A continuación, se describe el desarrollo y establecimiento de nódulos.

La formación de nódulos fijadores de nitrógeno requiere de dos procesos de desarrollo: su organogénesis y su colonización por el rizobio. No siendo dependientes el uno del otro, deben estar temporal y espacialmente coordinados para asegurar su correcto desarrollo (Oldroyd y Downie, 2008). La comunicación entre ambos participantes es iniciada por la planta exudando flavonoides fenólicos e isoflavonoides a la rizosfera (Recourt *et al.*, 1992; Charrier *et al.*, 1995; Mathesius *et al.*, 1998). Estos compuestos son percibidos por el rizobio, que por su lado produce factores de nodulación (factores Nod), que a su vez son reconocidos por la planta (Schmidt *et al.*, 1994; Lerouge *et al.*, 1990; Long, 1996). Los compuestos de este diálogo molecular son específicos de cada especie y determinan el reconocimiento entre simbioses. (Downie, 2010; Perret *et al.*, 2000).

La percepción de los factores Nod por la planta activa la ruta de señalización de la simbiosis. Empieza en las células epidérmicas, hasta llegar a las células del córtex. Esta cascada de transducción de la señal provoca una serie de cambios estructurales y bioquímicos (Oldroyd, 2013). Por un lado, de forma temprana, células del córtex y del periciclo comienzan a elongarse y a proliferar formándose el primordio del nódulo (Xiao *et al.*, 2014). Por otro, el pelo radical crece formando una curvatura en su ápice, englobando a la bacteria en su interior. Se forman a partir de esta curvatura los canales de infección, invaginaciones de forma tubular que guían a los rizobios hasta los tejidos internos del nódulo. (Gage, 2004). En las células del canal, el núcleo es reubicado en el sitio de infección, y retículo endoplasmático y citoesqueleto son alineados prediciendo la ruta del canal de infección (Nutman, 1959; Brewin, 2004). Los rizobios avanzan por división a lo largo del canal (Gage, 2004). La superficie bacteriana requiere oligo/polisacáridos en esta etapa, que podrían actuar como moléculas señalizadoras adicionales para con la hospedadora (Gage, 2004; Cooper, 2007; Gibson *et al.*, 2008; Oldroyd y Downie, 2008). Los canales crecen hacia los nódulos emergentes y se ramifican dentro del tejido en formación, donde las bacterias son liberadas e internalizadas en las células del nódulo por un proceso similar a la endocitosis (Brewin, 2004; Xiao *et al.*, 2014). En el interior de las células de los nódulos, los rizobios comienzan un complejo proceso de diferenciación hasta transformarse en bacteroides, estructuras semejantes a orgánulos con capacidad fijadora de nitrógeno (Vasse *et al.*, 1990; Haag *et al.*, 2013; Alunni y Gourion, 2016). Éste queda envuelto por una membrana de origen vegetal, la membrana del simbiosoma, que a pesar de originarse a partir de membrana plasmática, sufre modificaciones relacionadas con sus funciones específicas (Bapaume y Reinhardt, 2012). La membrana del simbiosoma es la principal responsable en el intercambio de nutrientes entre simbioses. Una célula de nódulo infectada puede contener miles de simbiosomas (Robertson y Lyttleton, 1984; Udvardi y Day, 1997; Limpens *et al.*, 2009).

En la zona central de los nódulos predominan las células infectadas, acompañadas de células no infectadas. Esta región se ve rodeada, de dentro hacia afuera por 6 tejidos de células no infectadas: el parénquima del nódulo, la endodermis, el córtex, la epidermis y el cilindro vascular, que conecta con la vasculatura de la raíz (Brown y Walsh, 1994; Guinel, 2009a; Guinel, 2009b). Siendo común lo anterior, en la naturaleza encontramos dos tipos nódulos (determinados e indeterminados) distinguibles por su estructura anatómica: (Oldroyd y Downie, 2008). Los nódulos determinados no tienen un meristemo apical persistente, por lo que en un momento dado de su desarrollo dejan de crecer. Los géneros *Lotus* o *Glycine*, por ejemplo, forman este tipo de nódulos. El desarrollo de sus células infectadas se da de manera sincrónica hasta que madura el nódulo. Suelen tener forma esferoidea y engloban múltiples bacteroides por simbiosoma. (Ferguson *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando el meristemo apical del nódulo se mantiene de forma permanente, se desarrollan nódulos indeterminados, que no cesan su crecimiento y, a diferencia de los anteriores, tienden a ser alargados y en estadios avanzados de crecimiento se ramifican. Además, un único bacteroide integra cada simbiosoma (Paau *et al.*, 1979; Crespi y Frugier, 2008; Popp y Ott, 2011). Debido al meristemo apical permanente, nódulos como los del género *Medicago* producen constantemente nuevas células infectables por el rizobio, generando una zonación estructural (Kereszt *et al.*, 2011). Como consecuencia, la anatomía del nódulo indeterminado está formada por diferentes zonas: la zona del meristemo apical o zona I; la zona de infección y diferenciación del bacteroide o zona II; la interzona II-III; la zona de fijación o zona III; y la de senescencia o zona IV que aparece en nódulos de tiempo avanzado (Figura 1). El tamaño del meristemo de la zona II e interzona es constante, mientras que las zonas III y IV van variando con la edad del nódulo (Lotočka *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014)

Figura 1. Estructura de un nódulo indeterminado. Esquema de la estructura de un nódulo indeterminado y su zonación (izquierda). Captura de microscopía óptica de una sección longitudinal de nódulo de *M. truncatula* (derecha).

El paso de rizobio a bacteroide viene cargado de profundos cambios fisiológicos en la bacteria y también presenta particularidades entre los tipos de nódulo: En el caso de los nódulos indeterminados, el rizobio se somete a endoreduplicación aumentando el número de copias de su cromosoma, su tamaño aumenta en torno a 5 veces, pueden ramificarse, su membrana se vuelve más permeable y los bacteroides completamente diferenciados no pueden volver a la vida libre, siendo dependientes de la planta (Kereszt *et al.*, 2011). Por otro lado, en los bacteroides desarrollados en nódulos determinados, la ploidía se mantiene y pueden ser cultivados independientemente de la planta tras su diferenciación. Estos cambios producidos en los rizobios están causados por péptidos ricos en cisteína liberados por la célula hospedadora, que modulan el desarrollo del bacteroide (Paau *et al.*, 1979; Mergaert *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2010; Kondorosi *et al.*, 2013; Montiel *et al.*, 2016; Ferguson *et al.*, 2018)

Una de las funciones predominantes del nódulo es producir un ambiente óptimo para que la FSN se lleve a cabo satisfactoriamente y se expresen las enzimas que median este proceso. Entre ellas, cabe destacar la nitrogenasa, la enzima directamente responsable del proceso de fijación (Miller *et al.*, 1993). Se trata de una metaloproteína que representa el 10% del contenido total de proteína en el bacteroide. Requiere un cofactor de hierro molibdeno específico (FeMoco) y otros dos complejos hierro-azufre (Fe-S) responsables de la reacción, donde se reduce N_2 a NH_3 , con un gasto de 16 ATPs (Miller *et al.*, 1993). Esto es facilitado por un entorno con concentraciones locales bajas de oxígeno, pues la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente por O_2 (Robson y Postgate, 1980; Appleby, 1984). La planta tiene varios mecanismos para mantener un ambiente de microaerobiosis: En primer lugar, controla la permeabilidad al oxígeno creando una barrera de difusión gaseosa en las capas más externas del nódulo, limitando el ratio de oxígeno que llega a las regiones centrales del nódulo (Hunt *et al.*, 1987). Además, el alto consumo energético en las células infectadas hacen que el oxígeno que alcanza a estas células se consuma tan pronto como entra (Preisig *et al.*, 1996). Por último, las células infectadas del nódulo sintetizan la leghemoglobina, una hemo-proteína citoplasmática que representa el 20% de la proteína del nódulo (Bergersen y Appleby, 1981). Une oxígeno con muy alta afinidad y tampona las concentraciones del mismo asegurando tensiones bajas que permiten el funcionamiento de la nitrogenasa, dejando suficiente oxígeno para que el bacteroide realice la respiración aeróbica (Bergersen y Appleby, 1981; Becana y Rodríguez-Barrueco, 1989; Iannetta *et al.*, 1993). Las concentraciones de oxígeno libre en zonas infectadas de los nódulos de leguminosa están en el rango nanomolar, cuatro órdenes de magnitud bajo los niveles de equilibrio de oxígeno en agua (Kuzma y Layzell, 1994; Udvardi y Poole, 2013).

Los altos niveles de expresión de estas metaloproteínas hacen que, para garantizar su funcionamiento, los nódulos reciban importantes cantidades de metales, siendo uno de los principales sumideros de estos nutrientes de la planta.

2. Homeostasis de metales en fijación simbiótica de nitrógeno

Algunos metales de transición como hierro, cobre o zinc son esenciales para las plantas (Clemens *et al.*, 2002; Morrissey y Guerinot, 2009; Pilon, 2011; Olsen y Palmgren, 2014; Foster *et al.*, 2014). Tanto la deficiencia como el exceso de estos micronutrientes pueden provocar defectos en el metabolismo y fisiología de las plantas. (Puig y Peñarrubia, 2009; Palmer y Guerinot, 2009; Yruela,

2009; Jain *et al.*, 2014). En el caso de la deficiencia, esto se debe a que una tercera parte de las proteínas de una célula típica son metaloproteínas, interviniendo en la mayoría de los procesos biológicos (Dupont *et al.*, 2006; Finkelstein, 2009; Foster *et al.*, 2014). El hierro (Grotz y Guerinot, 2006; Brear *et al.*, 2013), participa en la respiración celular (Levi y Rovida, 2009), en la síntesis y estabilidad de la clorofila y en el transporte de electrones en la fotosíntesis entre otros procesos. (Pushnik *et al.*, 1984). El cobre es un elemento esencial como cofactor activo de las reacciones redox de múltiples procesos biológicos como la respiración celular o la fotosíntesis. En la respiración, es indispensable para el correcto funcionamiento de la citocromo oxidasa (COX) (Horn y Barrientos, 2008). Una de las cuproproteínas más abundantes en plantas es la plastocianina, encargada de transferir electrones del citocromo b_6f a el fotosistema I. (Gross, 1993; Puig y Peñarrubia, 2009; Ravet y Pilon, 2013). Tiene también importancia en la defensa de estrés oxidativo, formando parte de las Cu/Zn Superóxido Dismutasas (Cu/Zn SOD) (Becana *et al.*, 2010), o formando parte estructural de otras proteínas como las feroreductasas (FRO) (Peñarrubia *et al.*, 2015). Además, es usado como cofactor por proteínas envueltas en la lignificación de la pared celular, formación de polen, metabolismo glucídico, en la percepción de etileno y la formación de fenoles en la respuesta contra patógenos (Clarkson, 1996; Rodríguez *et al.*, 1999; Burkhead *et al.*, 2009). El zinc es parte integral de multitud de enzimas envueltas en el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Ishimaru *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2012), y es crítico para proteínas de unión a ADN como los factores de transcripción de dedos de zinc (Bashir *et al.*, 2012). Estudios de metaloproteómica señalan que en torno al 9% de las proteínas de eucariotas tienen capacidad de unir zinc (Andreini *et al.*, 2006).

A pesar de la importancia de los metales de transición, existe una amplia prevalencia de suelos limitantes en la biodisponibilidad de éstos (Alloway, 2008; White y Broadley, 2009), lo que limita el crecimiento de las plantas, provoca estrés, reduce la productividad de las mismas y produce alimentos de menor calidad alimenticia (Grotz y Guerinot, 2006; White y Broadley, 2009; Alloway, 2012; Akkermans *et al.*, 2016). El desarrollo y funcionamiento del nódulo y por tanto la FSN también quedan limitados en condiciones de baja disponibilidad de metales (Tang *et al.*, 1991) y se ha observado que la planta activa sus mecanismos de respuesta a deficiencia a metales cuando se nodula (Terry *et al.*, 1991). Como consecuencia, se han realizado esfuerzos considerables para optimizar la nutrición mineral en suelos limitantes en metal, ya sea usando fertilizantes metálicos o desarrollando nuevas variedades mejoradas en la toma de estos micronutrientes (Hirschi, 2009; Larbi *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012; Masuda *et al.*, 2012; Eggert y von Wirén, 2013; López-Rayó *et al.*, 2015). Por tanto, tiene especial interés el estudio de la homeostasis de metales en la FSN: su nutrición, su tráfico intracelular y la regulación del sistema (Brear *et al.*, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2014; González-Guerrero *et al.*, 2016).

2.1 Metales de transición: desde la rizosfera al nódulo

Para captar los metales del suelo, las leguminosas usan la llamada Estrategia I, basada en la acidificación del suelo, posterior reducción del metal ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}/Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+}$) y su incorporación a través de la epidermis (Palmer y Guerinot, 2009). Así, para mejorar la solubilidad de compuestos en suelos alcalinos se usan H^{+} -ATPasas para bajar el pH ayudado a liberar el metal de quelatos insolubles y crea un potencial de membrana negativo que favorece su adquisición (Santi y Schmidt, 2009). Sin embargo,

los transportadores generalmente tienen una afinidad específica por estados de oxidación concretos para cada metal. En el caso del hierro o el cobre necesitan ser reducidos para que sus transportadores específicos puedan importarlo (Jain *et al.*, 2014). Esto es llevado a cabo por proteínas de la familia ferredoxinas oxidasa (FRO) que reducen su estado de oxidación aún en la rizosfera (Robinson *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2003). Una vez disponibles, los metales deben ser incorporados al interior de las células de la epidermis a través de transportadores. El Cu^+ , es importado por proteínas de la familia COPT (Dancis *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2002; De Feo *et al.*, 2009; Sancenón *et al.*, 2003; Sancenón *et al.*, 2004). En el caso de metales en formas divalentes, como el Fe^{2+} o Zn^{2+} , se adquieren por miembros de las familias de transportadores ZIP y NRAMP (Eide *et al.*, 1996; Grotz *et al.*, 1998; Curie *et al.*, 2000; Guerinot, 2000; Mizuno *et al.*, 2005; Castaings *et al.*, 2016). Una vez en la raíz, los nutrientes viajan de por vía apoplástica o simplástica (Burch-Smith y Zambryski, 2012), hasta llegar a la endodermis, donde el transporte a través del apoplasto queda bloqueado. En este punto intervienen transportadores de las familias P_{1b} -ATPasas (Mills *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2004; Williams y Mills, 2005) y ferroportinas (FPN) (Morrissey *et al.*, 2009). Una vez en el haz vascular, los metales van quelados a compuestos orgánicos como la nicotianamina (Clemens *et al.*, 2013; Curie *et al.*, 2009), ácidos orgánicos como el citrato (Meyer *et al.*, 2010) o aminoácidos como la histidina (Harris *et al.*, 2012; Alvarez-Fernández *et al.*, 2014). Por el haz vascular los nutrientes viajan hasta que son descargados en los distintos órganos sumideros. Aunque esta etapa está menos caracterizada, parece que, entre otros, participan transportadores entre las familias OPT (*Oligopeptide transporter*) e YSL (*Yellow Stripe-Like proteins*) (Lubkowitz, 2011; Curie *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2006),

2.2 Descarga de metales en nódulos y su movilización hasta las células infectadas de nódulo.

Estudios de visualización de metal mediante fluorescencia de rayos X obtenidos en sincrotrón en nódulos de *M. truncatula*, indican que el hierro se lleva al nódulo a través de la vasculatura, (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013) y posiblemente el resto de metales de transición y otros nutrientes llegan de esta manera. Así, en la zona II del nódulo, el hierro se localiza principalmente en el apoplasto, mientras que en la zona III se observa predominantemente en el interior de las células. En la zona de senescencia la concentración de metal disminuye en células infectadas. Esto sugiere que la descarga de nutrientes minerales al nódulo se produce desde la vasculatura en la zona II (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013). Así, una vez han llegado a la zona II del nódulo, los metales de transición deben de nuevo atravesar la endodermis y continuar apoplásticamente hasta las células infectadas de nódulo. Posteriormente, los nutrientes han de atravesar la membrana del simbiosoma, y después las del propio bacteroide (Figura 2) (Udvardi y Poole, 2013; González-Guerrero *et al.*, 2016).

Se han descrito dos transportadores tipo YSL (MtYSL1 y MtYSL8) en *M. truncatula* que parecen participar en la descarga de metal a nódulos (Castro-Rodríguez, 2017). Los transportadores YSL solo se encuentran en plantas y pertenecen a la familia de transportadores OPT (Conte *et al.*, 2013). Estos transportadores no unen metal libre como sustrato, sino que suelen transportar metal unido a nicotianamina o pequeños péptidos (Curie *et al.*, 2009). Ambos MtYSL1 y MtYSL8 localizan en las células adyacentes del haz vascular y endodermis de nódulo y raíz. Los mutantes muestran en los dos casos una reducción del 60% en la actividad nitrogenasa respecto a plantas silvestres, además de

alteraciones en la homeostasis de cobre y zinc, en el caso de MtYSL1, y de hierro en MtYSL8. (Castro-Rodríguez 2017). Por otro lado, recientemente se ha descrito un transportador de molibdato en *M. truncatula*, MtMOT1.2 que localiza en la endodermis de raíz y nódulo y su presencia es necesaria para una correcta FSN (Gil-Díez *et al.*, 2019).

Ya en el apoplasto de la zona II del nódulo, el metal debe ser incorporado a células infectadas, se han descrito distintos genes implicados. Se han caracterizado varios importadores de metal que localizan en la membrana plasmática de células infectadas de nódulo. Estos son *MtNRAMP1* para hierro (Tejada-Jiménez *et al.*, 2015), *MtZIP6* para zinc (Abreu *et al.*, 2017), *MtCOPT1* para cobre (Senovilla *et al.*, 2018) y *MtMOT1.3* para molibdato (Tejada-Jiménez *et al.*, 2017). En todos los casos la ausencia o el silenciamiento de expresión estos genes produce una reducción de biomasa, en la actividad nitrogenasa y alteraciones en la homeostasis del metal que transportan. Se demuestra para cada gen que su presencia es esencial para que se produzca un efectivo aporte de metal al nódulo que permita un desarrollo correcto de la FSN. El citrato parece participar en la llegada del hierro al citosol de las células, como indica el estudio de MtMATE67 (Kryvoruchko *et al.*, 2018). Se trata de un transportador de citrato que se expresa principalmente en la zona II del nódulo y localiza tanto en la membrana plasmática de células infectadas como en la membrana del simbiosoma. Mutantes de pérdida de función para este gen acumulan hierro en el apoplasto y presentan una caída sustancial de la actividad nitrogenasa y del crecimiento de la planta (Kryvoruchko *et al.*, 2018). Además, al localizar en la membrana del simbiosoma, podría facilitar la solubilidad y disponibilidad de hierro en el espacio bacteroidal.

Figura 2. Esquema del transporte de metales en el nódulo. MP: Membrana plasmática; MS: Membrana del simbiosoma; MEB: Membrana externa del bacteroid; MIB: membrana interna del bacteroide.

2.3 Tráfico intracelular de metales en las células infectadas de nódulo

Una vez en las células infectadas, el metal debe ser transportado a los mismos orgánulos y aceptores que en una célula corriente (Luk *et al.*, 2003), pero además a la maquinaria específica de las células de nódulo y al simbiosoma. En este punto cobran especial interés dos niveles de regulación: los transportadores de metal que exportan desde el citosol y las metalochaperonas (O'Halloran y Culotta, 2000; Arnesano *et al.*, 2002; Markossian y Kurganov, 2003; Bharathi *et al.*, 2016). Existe la posibilidad de que los metales sean distribuidos atendiendo simplemente a la demanda de nutrientes por parte de los diferentes orgánulos, pero cabe esperar que haya una regulación directa, que establezca cuotas accesibles sólo para aceptores concretos como enzimas que necesitan metalación para su maduración o transportadores que redistribuyan metal a orgánulos concretos. Así pues, esta coordinación de metal a nivel intracelular no va a venir únicamente mediada por las afinidades de las distintas proteínas a éste, sino que se han desarrollado rutas de tráfico intracelular que dirigen la distribución de metal (Huffman y O'Halloran, 2001; Luk *et al.*, 2003; Culotta *et al.*, 1999). Dado que no existen apenas trabajos relativos a este ámbito en nódulos de leguminosa, para el desarrollo de este apartado nos apoyamos en estudios en otros modelos que nos permitan aproximarnos al entendimiento de la homeostasis de metales en células infectadas de nódulo.

2.3.1 Transportadores. Distribuyendo a los compartimentos celulares

Los transportadores que exportan desde el citosol hacia el espacio extracelular o al interior de compartimentos celulares son elementos claves en la distribución intracelular de los metales de transición. Las cuatro familias mejor estudiadas son: ferroportinas (FPN) (Morrissey *et al.*, 2009), *Vacuolar Iron Transporter 1/Ca²⁺ sensitive Cross-Complementer 1* (VIT1/CCC1) (Li *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006), *Cation Difusion Facilitator* (CDF) (Ricachenevsky *et al.*, 2013; Kolaj-Robin *et al.*, 2015), y las P_{1b}-ATPasas (Argüello *et al.*, 2007). A continuación se detallan, haciendo especial hincapié en las dos últimas pues, como veremos, son las principales candidatas a tener miembros responsables de la introducción de zinc y cobre en el simbiosoma.

Las ferroportinas, solo están presentes en eucariotas (Muckenthaler *et al.*, 2008; Morrissey *et al.*, 2009). Aunque ningún miembro de la familia ha sido cristalizado, se predicen 11 dominios transmembrana con un gran dominio extracitosólico entre los dominios transmembrana 5 y 6 (Yeh *et al.*, 2011). Sus sustratos son el Fe²⁺, Ni²⁺ y Co²⁺ (Schaaf *et al.*, 2006; Muckenthaler *et al.*, 2008; Morrissey *et al.*, 2009) y el mecanismo de transporte está aún por determinar. De igual modo, la familia VIT1/CCC1 importa Fe²⁺ y Mn²⁺ al lumen de las vacuolas, mediando el almacenamiento de hierro y manganeso (Lapinskas *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001). Apenas se ha avanzado en el estudio de su estructura y mecanismo de transporte, aunque aproximaciones *in silico* predicen 5 dominios transmembrana (Kim *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, VIT1 es necesario para el almacenaje de hierro en los embriones en la semilla para que luego sea usado en la germinación. (Kim *et al.*, 2006). También se ha caracterizado un transportador de la familia relacionado con la FSN: SEN1 de *Lotus japonicus*. Este gen se transcribe específicamente en nódulo y su mutación interrumpe el desarrollo del nódulo de forma temprana, por lo que parece que es imprescindible para la FSN. A pesar de no haberse localizado *in vivo*, se sugiere que

es el responsable de introducir hierro en el simbiosoma (Hakoyama *et al.*, 2012).

Los transportadores CDF se encuentran presentes en todos los organismos (Kolaj-Robin *et al.*, 2015). Transportan metales divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} o Mn^{2+} hacia fuera del citosol, acoplados en antiporte a protones o Na^+ (Rubio-Sanz *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014; Raimunda y Elso-Berberián, 2014). Han sido descritos en diferentes membranas como la del Golgi (Kirschke y Huang, 2003), retículo endoplasmático (Delhaize *et al.*, 2003), vacuola (MacDiarmid *et al.*, 2000), núcleo (Li y Kaplan, 2001) o la propia membrana plasmática (Yuan *et al.*, 2012). La proteína es funcional de forma dimérica. El monómero presenta 6 dominios transmembrana y un dominio C-terminal hidrofílico en la zona citoplasmática. Es habitual que tengan una región rica en histidina en el citosol entre los dominios transmembrana 4 y 5 (Lu y Fu, 2007; Kolaj-Robin *et al.*, 2015). Los estudios de estructura y caracterización YiiP de *E. coli* proveen de herramientas para entender los mecanismos de transporte de estas proteínas (Lu y Fu, 2007; Lu *et al.*, 2009). YiiP es un homodímero formado por dos subunidades de 33 KDa que pliegan simétricamente (Wei y Fu, 2006; Lu y Fu, 2007). Cada monómero presenta tres diferentes sitios de coordinación de $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ localizados en la región transmembrana (sitio I), en el espacio membrana-citosol (sitio II, no conservado en todos los CDFs), y en el dominio C-terminal (sitio III) (Lu y Fu, 2007; Lu *et al.*, 2009). El sitio I es el que une el metal transportado (Wei y Fu, 2006; Lu y Fu, 2007) y define la selectividad de YiiP a $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ frente a Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} . Este centro de unión está compuesto por dos residuos de aspartato del segundo dominio transmembrana, un residuo de histidina y otro de aspartato en el quinto dominio transmembrana. Une metal en una coordinación tetrahédrica (Anton *et al.*, 2004; Wei y Fu, 2005; Wei y Fu, 2006). Los estudios sugieren que cuándo el Zn^{2+} se une al sitio I, se produce un cambio conformacional que rápidamente moviliza el metal, asegurando un transporte irreversible y unidireccional (Chao y Fu, 2004). El cambio conformacional alternativamente expone este sitio a una u otra cara de la membrana, permitiendo el intercambio de iones (Gupta *et al.*, 2014). Un estudio reciente de un segundo cristal del transportador YiiP de *Shewanella oneidensis* corrobora esta coordinación de Zn^{2+} (Lopez-Redondo *et al.*, 2018). Se ha especulado que el sitio III pudiera interactuar con metalochaperonas (Lu y Fu, 2007), aunque no hay evidencias experimentales para esta hipótesis. El sitio III parece estar involucrado en la dimerización de YiiP y por tanto, en su activación. El Zn^{2+} se coordina de forma tetrahédrica por aminoácidos de cada monómero contribuyendo a la estabilización del dímero, lo que parece ser un mecanismo de regulación alostérica en el cual el transportador dimeriza en presencia del sustrato (Lu *et al.*, 2009). En plantas son conocidos como *Metal Tolerance Protein* (MTP) (Ricachenevsky *et al.*, 2013) ya que los primeros identificados se relacionaron con tolerancia a exceso de metal, como en el caso de AtMTP1 de *Arabidopsis* (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005), aunque de forma general, participan en la detoxificación de metal, la metalación de proteínas y la distribución a distintos compartimentos celulares o al apoplasto (Haydon y Cobbett, 2007; Ellis *et al.*, 2005; Lichten y Cousins, 2009). Varios MTP/CDFs son transportadores que introducen zinc a la vacuola en distintos órganos (Ricachenevsky *et al.*, 2013). Ejemplos son AtMTP1 y AtMTP3 de *A. thaliana* (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Arrivault *et al.*, 2006; Kawachi *et al.*, 2009) OsMTP1 de *O. sativa* (Menguer *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2012), o PrdMTP1 en *Populus* (Blaudez *et al.*, 2003). Otros trabajos, muestran como las subunidades pueden conformarse como heterodímeros, es el caso de AtMTP5 y AtMTP12 o CsMTP5 y CsMTP12 de pepino, que son funcionales heteroméricamente

e introducen zinc en el aparato de Golgi (Fujiwara *et al.*, 2015; Migocka *et al.*, 2018). Sin embargo, en la especie hiperacumuladora de Zn y Cd *Arabidopsis halleri*, se han identificado que su genoma tiene 4 parálogos de MTP1 que provocan una sobreexpresión del gen y confiere a la planta hipertolerancia al metal (Shahzad *et al.*, 2010; Dräger *et al.*, 2004). Además, recientemente se ha caracterizado *AtMTP8* que participa en la acumulación de manganeso y hierro durante el desarrollo de la semilla en las células subepidérmicas de los dos cotiledones y en las células corticales del hipocotilo. También participa en su movilización durante la germinación, indicando un papel importante para una eficiente germinación bajo condiciones ambientales adversas (Eroglu *et al.*, 2017). En legumbres, se ha caracterizado *MtMTP1* en *M. truncatula*, pero no se ha relacionado la proteína con la FSN (Chen *et al.*, 2009).

Las P_{1b} -ATPasas son transportadores que comparten un núcleo estructural y mecanismos catalítico con el resto de ATPasas tipo P (Argüello *et al.*, 2007). Están presentes en organismos de todos los reinos (Sharma *et al.*, 2000; Argüello *et al.*, 2007; Raimunda *et al.*, 2011) y su dirección de transporte es hacia fuera del citosol (Mandal *et al.*, 2002). En eucariotas, se pueden encontrar en prácticamente todos los orgánulos (vacuola, trans-Golgi, cloroplastos o membrana plasmática) (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b; La Fontaine y Mercer, 2007; Morel *et al.*, 2009), donde asisten a la detoxificación de metal y síntesis de metaloproteínas (Morel *et al.*, 2009; Boutigny *et al.*, 2014). Se trata de transportadores monoméricos de 6 a 8 dominios transmembrana con dominios de unión a metal. Presentan un dominio ATPasa, un dominio activador y otro de fosforilación también citosólicos. Además, muchas P_{1b} -ATPasas tienen varios tipos de dominios citoplasmáticos en los extremos N- y C-terminal. El dominio citosólico típico, observado en Cu^{+} -ATPasas, tiene 60-70 aminoácidos que pliegan en una estructura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ con un motivo CXXC conservado con capacidad de unir metal (Argüello *et al.*, 2007; Rosenzweig y Argüello, 2012). Aminoácidos conservados de los tres últimos dominios transmembrana confieren especificidad de sustrato, permitiendo hacer una subclasificación de al menos 7 grupos (Smith *et al.*, 2014). Los dominios transmembrana de estos aminoácidos conservados flanquean una región citosólica que permite la exportación del metal mediante la hidrólisis de ATP (Argüello *et al.*, 2007; González-Guerrero *et al.*, 2008b; Morin *et al.*, 2009). Varias P_{1b} -ATPasas han sido descritas en plantas, por ejemplo, *AtHMA2* y *AtHMA4* son las principales responsables de introducir Zn^{2+} en el xilema en *A. thaliana*. Ambas localizan en la membrana plasmática de vasculatura de raíces y partes aéreas (Hussain *et al.*, 2004). *AtHMA5* parece ser la responsable de la translocación de cobre al haz vascular (Andrés-Colás *et al.*, 2006). Localizando en otras membranas, *AtRAN1* introduce el cobre al lumen reticular para la ruta secretora (Woeste y Kieber, 2000; Hirayama *et al.*, 1999). En el cloroplasto *AtPAA1* localiza en su membrana interna e introduce cobre en el estroma (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b; Shikanai y Fujii, 2013) para que posteriormente *AtPAA2*, que ancla en el grana, lo transporte al espacio tilacoidal. Trabajando en tándem, suplen la demanda de cobre de la plastocianina (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b; Tapken *et al.*, 2012).

Además de lo anteriormente mencionado, dos estudios identificaron dos transportadores de la familia ZIP y Nramp relacionados con la homeostasis de metal en la membrana de simbiosoma de nódulos de *G. max* (Moreau *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2003). Sin embargo, los transportadores de estas familias transportan metal hacia el citosol (Gunshin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008), por lo que probablemente GmZIP1 y GmDMT1 estén relacionados con el transporte de Zn^{2+} y Fe^{2+} respectivamente

desde el bacteroide a la célula infectada (Moreau *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2003). Otro transportador que ha sido localizado en la membrana del simbiosoma es el anteriormente mencionado *MtMATE67*, exportador de citrato (Kryvoruchko *et al.*, 2018). Pese a la dificultad de inferir si la relevancia de su aportación en la homeostasis de metales depende de la extrusión de citrato al apoplasto y/o al espacio bacteroidal, el marcado fenotipo de los mutantes, y la preferencia de *Bradyrhizobium japonicum* por el citrato como quelante de hierro en condiciones de vida libre sugieren la importancia de *MtMATE67* a este nivel (Guerinot *et al.*, 1990).

Aún faltan muchos esfuerzos para determinar los participantes en la entrega directa de metal al simbiosoma. En el caso del zinc y el cobre no se han detectado transportadores responsables al inicio de esta Tesis Doctoral. En base a su especificidad y dirección de transporte, MTP/CDFs y las P_{1b} -ATPasas parecen ser los candidatos a localizar en la membrana simbiosomal para introducir zinc y cobre al rizobio respectivamente.

2.3.2 Metalochaperonas: Distribuyendo el metal mediante interacción proteína-proteína

Las metalochaperonas son proteínas capaces de interaccionar con sus donadores y aceptores de metal de forma específica determinado por afinidad proteína-proteína y no proteína-metal mejorando así el control de la distribución de los metales de transición dentro de la célula (Capdevila *et al.*, 2017).

Se conocen distintos tipos de metalochaperonas involucradas en la síntesis de complejos orgánicos metálicos. Así, en las procariotas que tienen la enzima hidrogenasa, HypB recoge el Ni del transportador NikABCDE y participa en su transferencia al sitio activo de la enzima (Douglas *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2015; Lacasse *et al.*, 2016). Otro ejemplo es la frataxina, una proteína monomérica altamente conservada en todos los grupos de organismos. (Cho *et al.*, 2000; Dhe-Paganon *et al.*, 2000), que, entre otras funciones actúa como chaperona de hierro en la biogénesis de los complejos hierro-azufre (Fe-S) (Yoon y Cowan, 2004). En la biosíntesis del cofactor de molibdeno (Moco), Cnx1 actúa como insertasa de molibdeno catalizando los dos últimos pasos de la biosíntesis de Moco (Llamas *et al.*, 2006). En cuanto a la biosíntesis de nitrogenasa, NifQ es la proteína encargada de la incorporación de Mo en FeMoco (Imperial *et al.*, 1984; Hernandez *et al.*, 2008). Hasta el momento, ninguna chaperona de zinc ha sido identificada y caracterizada inequívocamente como tal (Capdevila *et al.*, 2017). En bacterias, una subfamilia de G3E GTPasas se predican como zinc-chaperonas, pero no ha sido demostrado empíricamente (Haas *et al.*, 2009). Igualmente en plantas, un grupo de proteínas llamadas HIPPs han sido propuestas como candidatas, pues presentan uno o varios motivos de unión a metal (CXXC) en su secuencia (Tehseen *et al.*, 2010; de Abreu-Neto *et al.*, 2013). Las Cu^+ -chaperonas son las mejor caracterizadas hasta la fecha. Están relacionadas con la interacción con transportadores del metal, el tráfico de cobre hacia mitocondrias y cloroplastos, la ruta secretora o con la activación de la Cu/Zn SOD (Robinson *et al.*, 1999; Cobine *et al.*, 2006; Peñarrubia *et al.*, 2015).

La primera Cu^+ -chaperona identificada fue ATX1 (*antioxidant1*) (Lin y Culotta, 1995; Lin *et al.*, 1997). Presenta homólogos en todos los organismos, nombrándose CopZ en bacterias y ATOX1 en mamíferos (Rosenzweig y O'Halloran, 2000; Rodríguez-Granillo y Wittung-Stafshede, 2008). Tienen

un dominio de unión a metal conservado, plegado en estructura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ que coordina un átomo de cobre en las cisteínas de un motivo XCXXC (Figura 3) (Rosenzweig *et al.*, 1999). Esta estructura tiene alta homología con los dominios citosólicos de unión de metal de las Cu^+ -ATPasas, manteniéndose el plegamiento $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ y el motivo XCXXC (Arnesano *et al.*, 2002). Se ha descrito cómo rutas intracelulares de distribución de metal pueden estar condicionadas por eventos jerárquicos, determinados por la unión de una chaperona concreta a los centros de unión a metal del transportador. Estudios funcionales y estructurales en *Archaeoglobus fulgidus*, indican que la transferencia de cobre al sitio de unión a metal de la Cu^+ -ATPasa AfCopA viene mediada por la interacción con la Cu^+ -chaperona AfCopZ, que llega cargada con el metal (González-Guerrero y Argüello, 2008). La interacción entre estas dos proteínas parece estar determinada por una geometría específica que aproxima el centro de unión de la Cu^+ -chaperona al sitio de incorporación de metal de la ATPasa (Padilla-Benavides *et al.*, 2013). En este caso, los dominios transmembrana 1 y 2 forman una plataforma en la que AfCopZ podría acoplarse para transferir el metal. Esta interacción está determinada por cargas electrostáticas de aminoácidos concretos en los que las negativas de la cara de la chaperona se acoplarían con las cargas positivas de esta plataforma (Padilla-Benavides *et al.*, 2013; Argüello *et al.*, 2016). Una transferencia similar se observa a la salida del sitio de unión a cobre en la Cu^+ -ATPasa (Padilla-Benavides *et al.*, 2014). CusF es una Cu^+ -chaperona periplásmica que participa de la exportación de cobre al exterior (Mealman *et al.*, 2011). Análisis *in silico* y ensayos bioquímicos muestran la interacción específica de la P_{1b} -ATPasa CopA con la forma apo de CusF para una posterior transferencia de metal (Padilla-Benavides *et al.*, 2014; Argüello *et al.*, 2016). Así, la transferencia de cobre desde y hacia chaperonas parece ser una parte integral del ciclo catalítico de las Cu^+ -ATPasas. La conformación que la enzima adopta durante el ciclo cambia y así, interacciona de forma distinta con las chaperonas alternativas (González-Guerrero *et al.*, 2009; Argüello *et al.*, 2016). En levaduras, se postula que ScATX1 recibe cobre de las regiones citosólica mediante la interacción con CTR1 (ortólogo de COPT1 de *Arabidopsis*) (Lin y Culotta, 1995; Xiao y Wedd, 2002). Posteriormente ScATX1 transfiere el cobre a la P_{1b} -ATPasa CCC2 (ortólogo de AtRAN1), incorporando el metal a la ruta secretora (Pufahl *et al.*, 1997). En *Arabidopsis*, se han identificados dos Cu^+ -chaperonas tipo ATX1: AtCCH (*Copper Chaperone*) (Himelblau *et al.*, 1998) y AtATX1 (Puig *et al.*, 2007). Las dos tienen el dominio plegado en $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ con el motivo CXXC conservado (Himelblau *et al.*, 1998; Puig *et al.*, 2007). Además, AtCCH presenta un dominio C-terminal específico de plantas

Figura 3. Estructura de una Cu^+ -chaperona típica, CopZ de *Enterococcus hirae* (PDB ID: 1CPZ). Puede observarse el plegamiento en $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ y las dos cisteínas del motivo CXXC de unión a cobre.

(Mira *et al.*, 2001). Mientras que este dominio se encuentra desplegado en solución, en presencia de detergentes aniónicos se altera electroforéticamente y forma fibrillas similares a amiloides bien ordenados (Mira *et al.*, 2004). Tanto *AtCCH* como *AtATX1* complementan la cepa mutante $\Delta atx1$ en levaduras y tienen patrones de expresión similares en senescencia y condiciones de estrés oxidativo, por lo que se proponen redundantes para algunos procesos (Puig *et al.*, 2007). Sin embargo, muestran otras diferencias funcionales. Primero, *AtATX1* interacciona *in vivo* con la *AtRAN1*, mientras que *AtCCH* sólo interacciona una versión truncada de la misma a la que se le ha eliminado el dominio C-terminal desplegado (Puig *et al.*, 2007). Segundo, sólo la expresión de *AtCCH* está regulada en tratamiento con cobre (Himelblau *et al.*, 1998). Y tercero, *AtCCH* se expresa únicamente en los tejidos del haz vascular y en células carentes de núcleo (Mira *et al.*, 2001). Estos trabajos sugieren la que este dominio C-terminal desplegado particular de plantas esté confiriendo especificidad funcional (Mira *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2007). Éste no es el único caso en el que una Cu^+ -chaperona tiene un dominio extra, en el caso de la archaia extremófila *Archaeoglobus fulgidus* tiene una *CopZ* con una región adicional en N-terminal de 130 aminoácidos cuyo cristal revela un dominio redox con un *cluster* 2Fe-2S y otro con un sitio de cuatro cisteínas capaz de unir Zn^{2+} (Sazinsky *et al.*, 2007), este último parece tener un papel estructural. *In vitro*, la proteína es capaz de unir 2 átomos de cobre, uno por la región conservada Cu^+ -chaperona y otro por la región adicional, y puede transferir el primero a la P_{1b} -ATPasa *CopA*. También se demuestra la capacidad de reducir Cu^{2+} a Cu^+ *in vitro*, gracias al *cluster* 2Fe-2S del dominio N-terminal (Sazinsky *et al.*, 2007).

La Cu^+ -chaperona, *CCS1* (*Copper Chaperone for Superoxide dismutase*), es la encargada de transferir el cobre y activar la *Cu/ZnSOD*, también fue primero descrita en *S. cerevisiae* (Culotta *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2001). Mutantes en *ScCCS1* presentan niveles atenuados de la actividad SOD (Rae *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, sólo se ha identificado un homólogo funcional de *ScCCS1* (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a) que codifica tanto para una forma citosólica como para otra plastidial a través del uso de codones de inicio alternativos (Chu *et al.*, 2005). En cuándo a la forma plastidial, está involucrada, junto con la Cu^+ -chaperona *AtPCH1* (*Plastidial Chaperone*), en la homeostásis de cobre del orgánulo (Shikanai y Fujii, 2013; Blaby-Haas *et al.*, 2014). No se conoce la proteína encargada de importar el cobre al espacio intermembrana del cloroplasto, pero una vez allí, *AtPCH1* transfiere metal a la P_{1b} -ATPasa *AtPAA1*, la cual lo introduce en el estroma (Blaby-Haas *et al.*, 2014). No está claro dónde *PCH1* capta el Cu^+ , el modelo más probable es que lo recoja en el citosol y cargada con el metal sea incorporada a través de la membrana externa al espacio intermembrana (Blaby-Haas *et al.*, 2014). Una vez en el estroma del cloroplasto, la *AtCCS* plastidial interacciona por un lado con *Cu/ZnSOD1* para su activación (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a), y por otro con *AtPAA2* (Blaby-Haas *et al.*, 2014) que localiza en el grana (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b). La interacción y transferencia de Cu^+ entre *AtCCS* plastidial y *AtPAA2* parece ser mediada a través del dominio N-terminal de la *AtCCS*, que tiene homología con chaperonas tipo *ATX1*. Resulta sorprendente encontrar esta interacción pues, a diferencia de *PCH1* que sí está conservada en el linaje de organismos fotosintéticos, *CCS* no está en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Blaby-Haas *et al.*, 2014). Además, mutantes en *AtCCS* no tienen defectos fotosintéticos notables (Cohu *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que *AtCCS* no es esencial en la ruta de cobre *PCH1-PAA1-PAA2* y que debe haber otros elementos en

juego. A pesar de ello, esta interacción entre AtCCS y AtPAA2 debe haber evolucionado para favorecer la distribución de cobre hacia la plastocianina (esencial para la fotosíntesis) respecto a la Cu/ZnSOD plastidial (no esencial) (Blaby-Haas *et al.*, 2014)

En la mitocondria, el cobre es requerido para el correcto ensamblaje y la actividad de la COX de la cadena respiratoria y en menor medida para la activación de la Cu/Zn SOD1 (Cobine *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2017; Brunori *et al.*, 2005). La metalación de estas dos enzimas ocurre en el espacio intermembrana del orgánulo. En el caso de la Cu/Zn SOD1, de nuevo es activada por la CCS1 (Field *et al.*, 2003; Kawamata y Manfredi, 2010) El cobre destinado para la COX es inicialmente transferido desde el citosol por ScCOX17 (Glerum *et al.*, 1996), que se incorpora en el espacio intermembrana y cede el metal a otras dos chaperonas, SCO1 y COX11, que maduran los sitios Cu_A y Cu_B de la COX respectivamente (Horng *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, se han descrito dos Cu⁺-chaperonas en la mitocondria, AtCOX17, homólogo del descrito ScCOX17 (Balandin y Castresana, 2002) y AtCOX19p, que participa en la biogénesis de la COX. (Attallah *et al.*, 2007) Este trabajo muestra que AtCOX19p se expresa sólo en condiciones de estrés biótico y abiótico y localiza la proteína en el espacio intermembrana, anclada a la membrana interna. Se sugiere que participa reemplazando formas dañadas de la COX producidas por condiciones de estrés (Attallah *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta la variedad y complejidad de rutas de la homeostasis intracelular de cobre, cabe pensar en la posibilidad de la presencia de una ruta específica, en la que participe al menos una Cu⁺-chaperona, que ceda el cobre al importador de la membrana del simbiosoma.

Objetivos

Los metales de transición son elementos esenciales para el correcto desarrollo de la FSN en leguminosas. Como se ha indicado en la introducción, se dispone de poca información de los mecanismos de tráfico intracelular de cobre y zinc en las células de nódulos de leguminosas. Con la intención de aportar conocimiento en esta área, fueron fijados los siguientes objetivos:

- Identificar genes de las familias MTP y Cu⁺-chaperonas citosólicas en *M. truncatula*.
- Determinar la expresión de estos genes en *M. truncatula* en presencia o ausencia del simbionte *S. meliloti*, para seleccionar aquellos con mayores niveles de expresión en nódulo.
- Determinar su distribución de la expresión y su localización protéica.
- Identificar el papel que juegan los genes seleccionados en la homeostasis de metales en la FSN.

Materiales y Métodos

1. Material biológico y condiciones de crecimiento

1.1. *Medicago truncatula*

En todos los experimentos realizados se han usado el ecotipo R108 de *M. truncatula* o las líneas mutantes NF11171 (*mtp2-1*), NF18305 (*mtp2-2*), NF12489 (*atx1-1*) y NF13867 (*atx1-2*), generadas en el Noble Research Institute de Ardmore, Oklahoma, EE.UU (Tagede et al., 2018). Su cultivo se inicia escarificando las semillas en 95 % (v/v) H_2SO_4 durante 7,5 minutos, y lavándolas 8 veces con agua a 4°C. Después son esterilizadas con 40 mg/ml de NaClO durante 90 segundos, y se lavan 6 veces con agua miliQ estéril. Las semillas son embebidas en agua estéril durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se depositan en placas de 0,8 % (p/v) agar en agua y se estratifican en oscuridad a 4°C durante 48 horas. Las semillas se germinan durante 24 horas a 22°C en oscuridad. Para su propagación se emplea turba:vermiculita (3:1) como sustrato, y se crecen en invernadero, en condiciones de 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C. Las plantas son regadas 3 veces por semana con agua. Respecto a los experimentos de plantas noduladas, las plántulas pregerminadas se trasplantan a macetas con perlita estéril y se inoculan con 2 ml de un cultivo saturado de la cepa de *S. meliloti* oportuna en cada experimento. Una vez crecidos, se sedimentan a 3000 x g y se resuspenden en agua. Las plantas inoculadas se crecen en invernadero (con 16 horas de fotoperiodo y temperatura entre 18-25 °C) y se riegan 3 veces por semana con agua o solución Jenner (Brito et al., 1994) (composición en apartado 2.1.2) en días alternos. En los casos en los que la planta fue crecida en condiciones no simbióticas, no se realiza inoculación y el riego es suplementado con 2 mM NH_4NO_3 cada 14 días.

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

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

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Gen mutado	Fenotipo	Origen
DY1457	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>	-	-	(MacDiarmid et al., 2000)
DY1457 <i>zrc1cot1</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 Zrc1::his3 cot1::ura3</i>	<i>zrc1cot1</i>	Supresión de crecimiento en alta concentración de zinc	(MacDiarmid et al., 2000)
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3</i>	-	-	Thermo Scientific
BY4741 <i>Δatx1</i>	<i>MATa his3 leu2 met1 ura3 Δsmf1</i>	<i>Δatx1</i>	Supresión de crecimiento en medios no fermentativos	Thermo Scientific

Cepa	Genotipo	Gen mutado	Fenotipo	Origen
BY4741 <i>Δsmf1</i>	<i>MATa his3 leu2 met1</i> <i>ura3 Δsmf1</i>	<i>Δsmf1</i>	Supresión de crecimiento a alta concentración de manganeso	Thermo Scientific
DY150	<i>MATa Ura3 leu2 trp1</i> <i>his3 ade2 can1</i>	-	-	Thermo Scientific
DY150 ccc1	<i>MATa Ura3 leu2 trp1</i> <i>his3 ade2 can1 ccc1:HIS3</i>	<i>ccc1</i>	Supresión de crecimiento en alta concentración de hierro	(Li <i>et al.</i> , 2001)

1.3. *Sinorhizobium meliloti*

Las tres cepas de *S. meliloti*, que han sido usadas como inoculantes de *M. truncatula*, están recogidas en la Tabla 2. Fueron crecidas en TY (Beringer, 1974) e YMB (Vincent, 1970) suplementado con los antibióticos correspondientes durante 48 horas a 28 °C de temperatura.

Tabla 2. Cepas de *S. meliloti*.

Cepa	Plásmido	Resistencia (μg/ml)	Genotipo	Origen
<i>S. meliloti</i> 2011	-	Estreptomicina 200 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ . Derivado de SU47	J. Dénarié
<i>S. meliloti</i> 2011	pCH60	Estreptomicina 200 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) Tetraciclina 10	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S.</i> <i>meliloti</i> 2011	Cortesía del Dr. Argüello (WPI, EE.UU) (Cheng and Walker, 1998)
<i>S. meliloti</i> 1021	pCMB13 DsRED	Estreptomicina 200 Espectinomicina 75 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU)	Nod ⁺ Fix ⁺ Derivado de <i>S.</i> <i>meliloti</i> 1021 Str21	Cortesía del Dr. Argüello (WPI, EE.UU) (Meade <i>et al.</i> , 1982)

1.4. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas se especifican a continuación y fueron crecidos en medio LB (Bertani, 1951) añadiendo los antibióticos correspondientes cuando fuera necesario, a 37 °C.

▪ ***Escherichia coli* DH5α (Hanahan, 1983):** Genotipo F⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1. Selección por interrupción de lacZ usando como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal).

▪ ***Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Wood, 1966):** *E. coli* str. B F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB(r_B-m_B)* λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*⁺]_{K-12} (λ^S) pLysS[T7p20 ori_{p15A}](Cm^R).

1.5. *Agrobacterium rhizogenes*

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

2. Medios de cultivo y solución de riego

Se describen a continuación las soluciones y medios de cultivo utilizados para el mantenimiento y desarrollo experimental de los sistemas biológicos descritos en el apartado anterior.

2.1 Medios y soluciones de plantas

2.1.1 Medio Fahreaus

Es el medio utilizado para el cultivo *in vitro* de *M. truncatula* (Dazzo, 1982).

1 mM CaCl₂

0,5 mM MgSO₄

0,7 mM KH₂PO₄

0,8 mM Na₂HPO₄

50 µM Citrato férrico (disuelto en 0,1 N HCl)

Micronutrientes: MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, Na₂MoO₄, H₃BO₃ a una concentración final de 0,1 µg/l cada uno.

1 % (p/v) Agar bacteriológico para medio sólido.

La solución se ajusta a pH 6,5.

2.1.1. Solución Jenner

Esta solución se emplea para regar las plantas cultivadas en sustratos inertes como la perlita.

5 mM CaSO₄

1 mM KCl

1 mM K₂HPO₄

1 mM MgSO₄

11,5 µM H₃BO₃

7,3 µM Citrato férrico en HCl 0,1 N

3,6 µM MnSO₄

0,38 µM ZnSO₄

0,16 μM CuSO_4

4 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

La solución se ajusta a pH 6,7.

2.2. Medios y soluciones de levaduras

2.2.1. Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)

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

2 % (p/v) Peptona bacteriológica

1 % (p/v) Extracto de levadura

2 % (p/v) Glucosa

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

2.2.2. Yeast Extract-Ethanol-Glycerol (YPEG)

El medio YPEG es un medio que utiliza glicerol y etanol como fuente de carbono.

2 % (p/v) Peptona bacteriológica

1 % (p/v) Extracto de levadura

1 % (p/v) Etanol

3 % (p/v) Glicerol

El medio sólido se prepara de igual modo añadiendo 2 % (p/v) de agar bacteriológico.

2.2.3. Synthetic Dextrose (SD)

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

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

2 % (p/v) Glucosa

El medio se ajusta a pH 5,4. El medio sólido se preparó de igual modo, añadiendo 2 % (p/v) agar bacteriológico. Cuando fue necesario, se adicionaron los siguientes requerimientos nutricionales: 0,01 % (p/v) adenina, uracilo, histidina, leucina, lisina, metionina, triptófano.

2.3. Medios y soluciones de bacteria

2.3.1. Tryptone Yeast (TY)

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

0,6 % (p/v) Triptona

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

0,05 % (p/v) CaCl_2

1 % (p/v) Agar bacteriológico para el medio sólido

2.3.2. Yeast Mannitol Broth (YMB)

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

0,04 % (p/v) Extracto levadura

0,1 % (p/v) Manitol

0,01 % (p/v) K_2HPO_4

0,02 % (p/v) MgSO_4

0,01 % (p/v) NaCl

2 % (p/v) Agar bacteriológico para el medio sólido

2.3.3. Lysogeny Broth (LB)

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

1 % (p/v) Triptona

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

1 % (p/v) NaCl

1 % (p/v) Agar bacteriológico para el medio sólido

2.3.4. Super Optimal broth with Catabolic repressor (SOC)

El medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (SOC) (Hanahan, 1983) es utilizado para para la recuperación de bacterias tras una transformación.

2 % (p/v) Triptona

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

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucosa

El pH se ajusta a 7,0 añadiendo 2 M NaOH

2.3.5. Terrific Broth (TB)

El medio se utiliza como medio de recuperación de células durante la preparación de células quimiocompetentes (Sambrook y Russell, 2006).

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

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

55 mM MnCl₂

2.3.6. 2x Yeast Triptone (2xYT)

Medio rico en triptona utilizado para la expresión de proteínas en *E. coli*

1.6 % (p/v) Triptona

1 % (p/v) Extracto de levadura

0.5 % (p/v) NaCl

3. Extracción de ácidos nucleicos de *M. truncatula*

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

- i. Tras 15 días de crecimiento en turba:vermiculita (3:1), Se recoge la primera hoja verdadera de cada planta y se congela en nitrógeno líquido. El material se homogeniza en frío.
- ii. Se añaden a cada homogeneizado 600 µl de tampón de extracción. Se incuba a 65 °C durante 20 minutos. Se agita 3 veces vigorosamente durante la incubación.
- iii. Se añaden 600 µl de cloroformo, se mezcla por inversión y se centrifuga a 10.000 x g durante 15 minutos.
- iv. Transferimos la fase acuosa del sobrenadante a un nuevo tubo que contiene 500 µl de isopropanol y 50 µl de 3 M acetato de sodio pH 5.2 que ha sido previamente preparado. Se mezcla por inversión y se precipita a -20 °C durante 60 minutos.

- v. Se centrifuga a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 70 %.
- vi. Se vuelve a centrifugar a 15.000 x g, esta vez durante 10 minutos. Se elimina por completo el etanol y se resuspende en 50 µl de agua MilliQ libre de DNAsas y se congelan las muestras a -20 °C.

Tampón de extracción: 100 mM Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano) pH 8.0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) pH 8.0; 2 % (p/v) CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio); 1 % (p/v) NaHSO₃

3.2. Extracción de ADN genómico de plantas

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

- i. Las muestras de hoja (entorno a 100 mg de tejido) previamente congeladas, se homogeneizan con nitrógeno líquido en mortero. Triturada la muestra, se añaden 800 µl de tampón AP1 y 8 µl de RNasaA directamente al mortero.
- ii. Se transfieren a un tubo de 1,5 ml e incuban 10 minutos a 65 °C. Agitamos vigorosamente 3 veces durante el periodo de incubación.
- iii. Se añaden 260 µl de tampón P3. Se mezcla por agitación e incuba durante 5 minutos en hielo.
- iv. Centrifugamos durante 5 minutos a 15.000 x g.
- v. Se transfiere el contenido del tubo a una columna QIAshredder depositada en un tubo colector de 2 ml. Centrifugamos durante 2 minutos a 15.000 x g.
- vi. El líquido es recogido en el tubo colector y transferido a un nuevo tubo, descartando el sedimento. Se añaden 1,5 volúmenes de tampón AW1 y se mezcla por inversión.
- vii. 650 µl de la mezcla son pipeteados en una columna DNeasy Mini encajada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifuga durante 1 minuto a 6.000 x g. Se elimina el líquido resultante y se repite este paso con el resto de la muestra.
- viii. La columna se cambia a un nuevo tubo colector. 500 µl de tampón de lavado AW2 son añadidos y se centrifuga durante 1 minuto a 6.000 x g. Se descarta el volumen recogido.
- ix. De nuevo, se añaden 500 µl de tampón AW2, y se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 x g. Se transfiere la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- x. Añadimos 50 µl de agua MilliQ, libre de DNAsas y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante 1 minuto a 6.000 x g.

- xi. Cuantificamos la muestra (apartado 3.6) y se conserva a -20 °C

3.3. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Un cultivo de 5 ml de *E. coli* saturado se centrifuga 1 minuto a 12.000 x g. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento de células se destina a la extracción de plásmido. Usamos el kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) del siguiente modo:

- i. El precipitado celular se resuspende en 250 µl de la solución A1.
- ii. Inmediatamente después se añaden 250 µl de la solución de lisis A2. Mezclamos por inversión e incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- iii. Se añaden 300 µl de la solución de neutralización A3. Se mezcla por inversión y se centrifuga durante 10 minutos a 11.000 x g. Recogemos el sobrenadante y lo transferimos a una columna NucleoSpin Plasmid.
- iv. Se centrifuga 1 minuto a 11.000 x g y se descarta el líquido retenido en el tubo colector.
- v. 600 µl de tampón A4 son añadidos en la columna y se centrifuga 1 minuto a 11.000 x g. Eliminamos el líquido del tubo colector.
- vi. Centrifugamos de nuevo durante 2 minutos a 11.000 x g para eliminar posibles restos de solución A4. La columna se transfiere un nuevo tubo de 1,5 ml.
- vii. Se añadieron 30 µl de agua MilliQ libre de DNAsas y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos 1 minuto a 11.000 x g para recoger la muestra purificada.
- viii. Cuantificamos la muestra (apartado 3.6) y se conserva a -20 °C.

3.4. Extracción de ADN plasmídico de levaduras

Transformantes de levaduras se crecen en 10 ml de medio SD suplementado con los suplementos determinados por las auxotrofías de cada cepa, durante 48 horas. Pasado ese tiempo, el DNA plasmídico es obtenido usando el siguiente protocolo:

- i. Cada cultivo se centrifuga a 12.000 x g. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 500 µl de agua estéril para lavar las células.
- ii. Tras transferir las células en suspensión a un tubo de 1,5 ml, se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad y se elimina el sobrenadante.
- iii. Posteriormente, las células son resuspendidas en 0,2 ml de tampón de extracción, 0,2 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de cuentas de cristal de 600 µm de diámetro estériles.

- iv. Agitamos vigorosamente la mezcla con ayuda de un vórtex durante al menos 4 minutos. Seguidamente añadimos 0,2 ml de TE y se centrifuga durante 5 minutos a 10.000 x g.
- v. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml. Se añade 1 ml de isopropanol y se incuba durante 16 horas a temperatura ambiente.
- vi. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 x g. Se descarta el sobrenadante y se lava el sedimento con 70 % (v/v) etanol.
- vii. Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad, se retira el sobrenadante y se deja secar el sedimento para eliminar el etanol residual.
- viii. El precipitado se resuspende en 50 µl de agua MilliQ libre de DNAsas.

La cantidad de plásmido obtenida de este tipo de extracción es poco eficiente, por lo que la elución será usada para transformar células electrocompetentes de *E. coli* (apartado 7.1.4), de las cuales posteriormente se extraerá plásmido para comprobar el mismo.

Tampón de extracción: 2 % (p/v) Tritón X-100; 1 % (p/v) SDS; 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 en plantas

La recolección de material vegetal para la extracción de RNA es realizada siempre entre las 10 y las 12 de la mañana, con la intención de minimizar los posibles cambios en la expresión génica relativos al ritmo circadiano y de asegurar que la transcripción de genes para la fijación de nitrógeno está activa. Cada muestra, compuesta al menos por tres plantas de una población crecida en una misma condición y elegidas al azar es congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C hasta su uso. La extracción de ARN sigue los siguientes pasos:

- i. Las muestras congeladas se muelen en mortero, con ayuda de nitrógeno líquido. Una vez trituradas, se añade 1 ml de Tri-Reagent® (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) en el mortero y se homogeneiza.
- ii. El extracto se transfiere a un tubo de 1,5 ml y se conservaron en frío mientras se procesan el resto de muestras.
- iii. Tras incubar el extracto 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 100 µl de cloroformo. Mezclamos por inversión y se vuelve a incubar 3 minutos más a temperatura ambiente.
- iv. Se centrifuga a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y la fase acuosa es transferida a un nuevo tubo y se añade 1 µl de glicógeno (concentración final 35 µg/µl) y 500 µl de isopropanol.
- v. Precipitamos durante 16 horas a -20 °C.

- vi. Dejamos descongelar las muestras en hielo y se centrifuga a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento es lavado con 75 % (v/v) etanol y se centrifuga a 7.500 x g durante 5 minutos a 4 °C.
- vii. Tras retirar el sobrenadante del lavado, dejamos evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente. Resuspendemos el precipitado en 40 µl de agua libre de RNAsas e incubamos durante 5 minutos a 60 °C.
- viii. Se realiza un tratamiento muestras con DNAsa para eliminar el ADN presente en la muestra. Para ello se añadió por cada muestra: 2,5 µl de DNAsa Turbo™ Ambion© (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU), 5 µl del Buffer de la DNAsa Turbo y 2,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Las muestras se incuban durante 30 minutos a 37 °C.

Para limpiar el RNA se usa el kit RNeasy© Mini de Qiagen (Valencia, CA, USA) según se detalla en los siguientes pasos.

- i. Ajustamos el volumen de la muestra a 100 µl con agua libre de RNAsa, y se añaden 350 µl de solución RLT y 3,5 µl de β-mercaptoetanol. Mezclamos por inmersión.
- ii. Se añade 250 µl de etanol. Se mezcla por inversión y se transfiere la muestra a las columnas RNeasy Mini.
- iii. Se centrifugan a 8.000 x g durante 1 minuto y se elimina el residuo líquido del tubo colector.
- iv. Se trata una segunda vez con DNAsa. Para ello se añade directamente a la columna, 80 µl de DNAsaI diluida en buffer RDD (10 µl de DNAsaI en 70 µl de Buffer RDD) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- v. Inactivamos la DNAsa, añadiendo 350 µl de solución RW1 en la columna y centrifugamos a 8.000 x g durante 15 segundos. Eliminamos el líquido del tubo colector.
- vi. Lavamos la columna con 500 µl de solución RPE y centrifugamos a 8.000 x g durante 1 minuto. Se elimina líquido del colector y se repite este paso otra vez.
- vii. Para la elución del ARN de la columna se añaden 30 µl de agua libre de RNAsas, y se incuba 5 minutos. Para recoger este ARN, se centrifuga a 8.000 x g durante 1 min.
- viii. Cuantificamos las muestras (apartado 3.6)
- ix. Corremos un gel de agarosa-MOPS (apartado 3.8) para asegurar que el ARN no se ha degradado.

3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos

El ADN y el ARN extraído es cuantificado con la ayuda de un Nanodrop ND-1000 UV/Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). 1 µl de la extracción es colocado en el lector. El

aparato indica la concentración. La absorbancia también es medida a 260 y 280 nm, con el objeto de identificar la presencia de fenol o proteínas en la purificación. La relación entre ambas longitudes de onda debe ser superior a 1,8 para considerarla limpia. También se mide la relación 260/230 nm para identificar la presencia o no de carbohidratos. Para considerar la muestra libre de estos el valor debe de ser superior a 2.

3.7. Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos son visualizadas en geles de 0,8 - 2 % (p/v) de agarosa en el tampón TBE. Los ácidos nucleicos a la luz azul, los geles son teñidos con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Como tampón de carga 6X se empleó 0,25 % (v/v) Orange G en 30 % (v/v) glicerol.

TBE: 0,1 M: Tris; 0,1 M H_3BO_3 y 2 mM EDTA.

3.8. Electroforesis para la visualización de ARN

Las muestras de ARN se visualizaron en geles de agarosa-MOPS ((Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico). Cada gel se prepara con 1,2 % (p/v) de agarosa en tampón MOPS, al que se le añade 2,5 ml de 37 % (v/v) formaldehído (por cada 50 ml). 500 ng de RNA son cargados en el gel junto con el tampón de carga. La electroforesis se realiza en tampón MOPS a un voltaje constante de 100 V durante 60 minutos. Las imágenes se obtuvieron utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

Tampón MOPS: 20 mM MOPS pH7; 5 mM Acetato Sódico; 1 mM EDTA disódico.

Tampón de carga 2X: 100 μ M formamida; 20 mM Tampón MOPS; 7 % (v/v) formaldehído; 0.78 M Bromuro de Etidio (5 mg/ml).

3.9. Recuperación de ADN desde geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ácidos nucleicos producto de PCR corridos en gel de agarosa se realiza con el kit NucleoSpin® Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Tras seleccionar las bandas de interés, ya cortadas y en un tubo de 1,5 ml, se realizan los siguientes pasos:

- i. Se añaden 200 μ l de solución NTI por cada 100 mg de gel y se calienta a durante 5-10 minutos a 50 °C, para fundir la agarosa. Durante ese tiempo, se agitaron los tubos con vórtex, cada dos minutos.
- ii. Con la muestra homogénea, se transfiere a una columna NucleoSpin® Gel y PCR Clean-up y se centrifuga durante 30 segundos a 11.000 x g.
- iii. Eliminamos el líquido residual retenido en el tubo colector y lavamos la columna añadiendo 700 μ l de la solución NT3. Centrifugamos 30 segundos a 11.000 x g.

- iv. Se repite el paso anterior una vez más.
- v. Para secar la columna de los restos de etanol, se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g.
- vi. Eliminamos el tubo colector y colocamos un tubo de 1.5 ml para la elución. Se añaden 20-30 μ l de agua MilliQ libre de DNAsas y se incuba durante 5 minutos, en el caso de fragmentos superiores a 2kb, a 70 °C. Tras la incubación, centrifugamos 1 minuto a 11.000 x g.

4. Síntesis de ADN complementario

En la síntesis de ADNc, 500 ng de ARN son usados de cada muestra. Se sigue el protocolo del kit PrimeScript® RT Reagent Kit (TAKARA, Kusatsu, Shiga, Japan), que detallamos a continuación:

- 5x PrimeScript® Buffer 5 veces diluido.
- 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 μ l.

Además, se añaden 0,5 μ l de RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), para garantizar la inhibición de RNAsas que puedan deteriorar la muestra. La reacción se incuba 15 minutos a 37 °C donde se realiza la transcripción reversa, después, durante 5 segundos a 85 °C, se inactiva esta. Una vez sintetizado a ADNc, el ARN se elimina incubando durante 30 minutos a 37 °C con 0,5 μ l de Ribonuclease H (RNase H) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se ha realizado con dos objetos. Para la comprobación de la presencia de una secuencia específica de ADN en una muestra dada o para la amplificación de fragmentos de ADN para su clonaje. Los oligonucleótidos empleados en ambos casos se muestran en el apartado 5.3. Las muestras son visualizadas en geles de agarosa como se describe en el apartado 3.6. En el caso de los fragmentos destinados al clonaje, la purificación de los mismos se realizó como está especificado en el apartado 3.8.

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

5.1.1. PCR para el clonaje de secuencias

La enzima utilizada en este caso es la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Elegimos esta polimerasa ya que tiene una tasa de introducción de errores 50 veces menor a la polimerasa convencional, facilitando los clonajes. En la reacción se utilizan 0,5 U de la polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a 200 μ M, los

oligonucleótidos 5' y 3' a 0,2 μ M, el tampón comercial a concentración de uso, 3 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y entre 10-20 ng de DNA molde en un volumen final de 25 μ l. En la Tabla 3, las condiciones de PCR utilizadas. La temperatura de hibridación es específica de cada pareja de oligonucleótidos.

Tabla 3. Condiciones estándar de PCR utilizadas.

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

5.1.2. PCR para la comprobación de fragmentos

La comprobación de fragmentos por PCR ha sido usada par validar la presencia de un fragmento clonado en bacteria o levadura (PCR de colonia), para asegurar la ausencia de amplificación de ADN en las extracciones de ARN o para el genotipado de mutantes a partir de ADN de planta. En todos estos casos se usaron dos tipos de polimerasas: la Taq Polimerasa de BIOTOOLS© y DreamTaq© (Thermo, Waltham, Massachusetts, EEUU). Los reactivos y sus concentraciones se detallan en la Tabla 4, las condiciones de PCR son las mismas descritas en la Tabla 3

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos usados para PCR.

Componentes	Concentración Final (25 μ l) Taq BIOTOOLS©	Concentración Final (25 μ l) DreamTaq©
10X tampón	1X	1X
dNTPs	200 μ M	200 μ M
Oligonucleótido 5'	0,2 μ M	0,2 μ M
Oligonucleótido 3'	0,2 μ M	0,2 μ M
Polimerasa	1 U	0.75 U

En el caso concreto de las PCR de colonia, el molde usado no es DNA purificado sino la propia colonia bacteriana a analizar, recogida con una punta estéril e introduciéndola en un tubo de PCR.

En el caso del genotipado de las líneas segregantes de *M. truncatula*, (líneas procedentes de la colección de mutantes de la Samuel Roberts Noble Foundation), las comprobaciones son realizadas mediante tres PCR (Figura 4). Con el objetivo de identificar el estado de homocigosis o heterocigosis del alelo de interés, cada muestra proveniente de una extracción de material vegetal de una planta individual es usada en las tres PCRs siguientes:

1. Tnt1-Tnt1: dos oligonucleótidos específicos del transposón de la inserción son usados (Tnt1-Fw + Tnt-Rv). Esta PCR debe ser positiva para todas las muestras de la población, se usa como control

positivo de que la extracción de DNA genómico es correcta.

2. Tnt1-específico: en este caso se usa un oligonucleótido de la inserción (Tnt1-Fw o Tnt-Rv) y otro específico del gen de interés.

3. Específico-Específico: los oligonucleótidos requeridos en este caso son dos específicos del gen de análisis que flanqueen la supuesta inserción.

Inserción del transposon en sentido 5'

- Secuencia repetida en sentido 5'
- Secuencia repetida en sentido 3'
- Oligonucleótido del transposón en sentido 5' (Tnt1-Fw)
- Oligonucleótido del transposón en sentido 5' (Tnt1-Fw)
- Oligonucleótido del transposón en sentido 5' (Tnt1-Fw)

Inserción del transposon en sentido 3'

Figura 4. Esquema representativo de un alelo de un gen que presenta una inserción del transposón *Tnt1*, que muestra las combinaciones de oligonucleótidos a usar para caracterizar los mutantes.

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

Para llevar a cabo este tipo de PCR, son usados los siguientes reactivos: 25 ng de ADNc, los oligonucleótidos específicos del transcrito a amplificar (750 mM de cada uno), y 6 μ l de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) hasta un volumen final de 10 μ l. Para cada par de oligonucleótidos utilizado, se puso un control negativo sin ADNc para descartar posibles contaminaciones. El equipo utilizado es StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU) con las condiciones de se recogen en la Tabla 5. La expresión del gen de estudio, se estandariza junto con la de otro gen constitutivo, en este caso, el gen de la *ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa* (*MtUb: Medtr4g077320*) de *M. truncatula*. Los niveles relativos de transcripción son calculados según el método de $2^{-\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 5. Condiciones estándar de qRT-PCR utilizadas.

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

5.3. Oligonucleótidos

A continuación, se recogen los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia	Uso
5 MtUb v4qF	ATTCTTCACATGCGGCGATTT AC	Expresión relativa de MtUbiquitin carboxyl-terminal hydrolase
3 MtUb v4qR	TTTCTCATTGCTTTTGGTGT GG	Expresión relativa de MtUbiquitin carboxyl-terminal hydrolase
5 MtMTP2 q996 F	TGGAGAGAACGCCAAGTGAG	Expresión relativa de MtMTP2
3 MtMTP2 q1105 R	GCCAGGTTCAGCCACTACAT	Expresión relativa de MtMTP2
Tnt1-3 F	TGTAGCACCGAGATACGGTAA TTAACAAGA	Genotipado de líneas mutantes
Tnt1-4 R	TCCTTGTTGGATTGGTAGCCA ACTTTGTTG	Genotipado de líneas mutantes
5 MtMTP2 NF11171 - 538 F	AATGTCTCAATTGCGTCTTC	Genotipado línea NF11171
3 MtMTP2 NF11171 336 R	GATTATACCCGAAAGATTGAT G	Genotipado línea NF11171
5 MtMTP2 Pst1 pDR196 F	TTTTTCTGCAGATGAAGCAAA TGGAACACGAG	Clonaje del cDNA de MtMTP2 cDNA para los ensayos de complementación en levaduras y genotipado de la línea mutante NF18305
3 MtMTP2 Xho1 pDR196 R	TTTTTCTCGAGTTACTCAATTT GTATGGTTACATGTTG	Clonaje del cDNA de MtMTP2 cDNA para los ensayos de complementación en levaduras y genotipado de la línea mutante NF18305

Continúa en la siguiente página

Tabla 6 (continuación). Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia	Uso
5 MtMTP2 XbaI pMBV F	CTTTTACAACAAATATAAAA ACAAGATCTCGACTCTAGAAT GACTTTTCTAGAATGGTTTA	Clonaje del cDNA de MtMTP2 cDNA para los ensayos de complementación en levaduras
3 MtMTP2 BamHI pAMBv R	CGATAAGCTTGATATCGAATT CCTGCAGCCCCGGGGGATCCTT ACTCAATTTGTATGGTTAC	Clonaje del cDNA de MtMTP2 cDNA para los ensayos de complementación en levaduras
5 MtMTP2 pGW F	GGGACAAAGTTTGTACAAAAA AGCAGGCTTTCTGAAAGAATC CCTATAC	Clonaje del promotor de MtMTP2 para plásmidos Gateway
3 MtMTP2 pGW R	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTAGCCTATAAAAAC AAATAAACC	Clonaje del promotor de MtMTP2 en pGWB3
5 MtMTP2 -1961Kb GW F	GGGACAAAGTTTGTACAAAAA AGCAGGCTTTGCTTTTTCCTA ACAGCAG	Clonaje de la región genómica de MtMTP2 para plásmidos Gateway
3 MtMTP2 full GW R	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTACTCAATTTGTAT GGTACATG	Clonaje de la región genómica de MtMTP2 para plásmidos Gateway
3 MtCystProt qPCR F	TTTTCTGCTTGGGATTGTGG	Expresión cuantitativa de MtCysteine proteinase
5 MtCystProt qPCR R	GTGATTCATCCACCGCTCAT	Expresión cuantitativa de MtCysteine proteinase
3 MtChit2 qPCR F	CATTTTCATCAACCCATGTTGG	Expresión cuantitativa de MtChitinase 2
5 MtChit2 qPCR R	TTGTTGGATTCAGCTCCAATG	Expresión cuantitativa de MtChitinase 2
5 MtATX1 q1191 F	AGATGATGATGATGATGATGA TGA	Expresión relativa de MtATX1
3 MtATX1 q1279 R	GTCAAAAGTTTCATAAGACAA AGG	Expresión relativa de MtATX1
5 MtATX1p -2177 GW F	GGGACAAAGTTTGTACAAAAA AGCAGGCTGCCAAAGTAATTG AATGTCTAGT	Clonaje de la región genómica de MtATX1 para plásmidos Gateway
3 MtATX1p -1 GW R	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTAGGCTTGAAGCTA GAATATAAGAAAAG	Clonaje del promotor de MtATX1 en pGWB3
3 MtATX1 1498 GW R	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTAATTTGAAGGGTG ATAACCATG	Clonaje de la región genómica de MtATX1 para plásmidos Gateway
3 MtATX1 Stop GW R	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTATTAATTTGAAGG GTGATAACCAT	Clonaje de la región genómica de MtATX1 para plásmidos Gateway
3 MtATX1 trun stop GW R	GGGACAAAGTTTGTACAAAAA AGCAGGCTTTATTCATTCAAA ATCTCTGCATGTTTAC	Clonaje de la región genómica de MtATX1 para plásmidos Gateway

Continúa en la siguiente página

Tabla 6 (continuación). Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia	Uso
3 ATX1-trun GW R	GGGGACCACTTTGTACAAGAA	Clonaje de la región genómica de MtATX1 truncada para plásmidos Gateway
	AGCTGGGTATTCATTCAAAT	
	CTCTGCATGTTTAC	
5 ATX1 N-pET16b tail F	AAAAAGAAAATCTTTATTTTC	Clonaje MtATX1 truncada y completa en pET16b
	AAGGTCATATGATGTCAACAA	
	ATGAACATGAGTC	

6. Clonación

6.1. Vectores usados

Los vectores usados en este trabajo están recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Vectores usados en este trabajo

Tipo	Nombre	Selección bacteria	Selección planta/levadura	Características	Descrito en
Vector de entrada	pDONR207	Gm	-	Vector de entrada	(Thermo Fischer)
Vectores binarios Gateway	pGWB1	Km	Km	Sin promotor ni etiqueta	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB3	Km	Km	Sin promotor, fusionado gen β -glucuronidasa	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB4	Km	Km	Fusión a GFP en C-terminal	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
	pGWB13	Km	Km	Sin promotor, fusionado a 3 epítomos HA en el extremo C-terminal	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
Vectores de expresión en levaduras	pAMBV	Km	Marcador seleccionable LEU2	Promotor ADH1	Cortesía del Dr S. Pollman (UPM)
	pDR196	Amp	Marcador seleccionable URA3	Promotor PMA1, marcador seleccionable lacZ, sin etiqueta	(Rentsch <i>et al.</i> , 1995)
Vectores de expresión en <i>E. coli</i>	pET16b-2xStrep-TEV-Strep	Amp	Amp	Promotor LacI Fusión a 2 epítomos de Strep-Tag en el extremo N-terminal y/o 1 epítopo en el extremo C-terminal	Modificado de pET16b (Novagen) Cortesía Dr. Rubio (UPM)

Las secuencias destinadas a ser clonadas por esta técnica son amplificadas por PCR con primers con colas de recombinación Gateway (ver apartado 5.1.1) y purificadas una vez corridas en gel de agarosa como se indica en el apartado 3.8. Una vez purificadas, se clonan por recombinación utilizando el sistema Gateway© (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). En esta recombinación son

necesarias dos reacciones, conocidas como BP y LR, en función de los *att* flanqueantes usados en el proceso de recombinación. En el caso de la reacción BP, el producto de PCR de interés (con sitios *attB*), recombina con el plásmido de entrada pDONR207, gracias a la acción de una clonasa BP (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, EEUU). Esta recombinación crea un clon de entrada con sitios *attL*, capaz de recombinar con vectores de destino que presentan sitios *attR*, gracias a la acción de la clonasa LR. Los vectores de destino usados en esta tesis son los detallados en la Tabla 8. En ambas reacciones se usan 75 ng de inserto y vector, se añade 1 U de la enzima y se ajusta a un volumen 5 μ l. La reacción se incubaba a temperatura ambiente durante al menos 2 horas, el producto de la reacción fue usado para transformar *E. coli* DH5 α .

6.3. Clonación por recombinación homóloga

Esta técnica de clonación permite unir fragmentos de ADN sin la necesidad de usar una ligasa, sino que se usa la maquinaria natural del organismo de destino de reparación de ADN, ya sea, en este trabajo, *E. coli* o *S. cerevisiae*. Para ello, es necesario que el fragmento de PCR que queremos introducir sea amplificado con oligonucleótidos que presenten colas de unas 40 pares de bases de homología en sus extremos con el vector de destino. Este vector de destino debe haber sido linealizado previamente con al menos una enzima de restricción, corrido en un gel de agarosa y purificado. Las 40 pares de bases de las colas de nuestro amplicón deben complementar con los extremos que quedan del plásmido linealizado. Una vez el amplicón y el plasmido linealizado están purificados, son usados en un ratio molar 4:1 para transformar las células competentes que correspondan (Koskela y Frey, 2015).

7. Transformación

7.1. Transformación de células de *E. coli*

7.1.1. Preparación de células quimiocompetentes

La preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* está descrita a continuación.

- i. Se inocula 250 ml de SOB con 50 μ l de un cultivo saturado de células *E. coli*.
- ii. Se incubaba el matraz a 18 °C en agitación durante 48 horas hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,6 - 0,7. Una vez alcanzada esta DO, se enfria el cultivo en hielo. El resto de pasos se realizaron en frío.
- iii. Se transfiere el cultivo a tubos de centrifuga fríos (atemperados previamente en el hielo durante al menos 15 minutos).
- iv. Se centrifugan las células a 5.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se retira el sobrenadante.
- v. Se resuspenden las células en 80 ml de TB y se incuban 10 minutos en hielo.
- vi. Se centrifugan las células de nuevo a 5.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.

- vii. Las células se vuelven a resuspender en 20 ml de TB y añadimos glicerol estéril a una concentración final del 20 % (v/v). Incubamos durante 10 minutos en hielo.
- viii. Se reparten en tubos de 1,5 ml alícuotas de 400 μ l y se congelan en nitrógeno líquido. Se conservan a -80 °C hasta su uso.

7.1.2. Transformación de células quimiocompetentes

Las células de *E. coli* competentes, guardadas a -80 °C, se dejan descongelar en hielo. Una vez descongeladas, seguimos el siguiente protocolo:

- i. Se añaden 10-150 ng de producto de reacción de clonaje o de los productos para la recombinación homóloga a un volumen de 50 μ l de células quimiocompetentes DH5 α .
- ii. La mezcla es incubada en hielo durante 30 minutos.
- iii. Posteriormente, realizamos un choque térmico de 42 °C durante 45 segundos, tras el cual, el tubo con la mezcla vuelve al hielo durante 2 minutos.
- iv. Para la recuperación de las células se añade 1 ml SOC y se incuba a 37 °C durante una hora.
- v. Las células recuperadas son plaqueadas en LB con los antibióticos requeridos por el plásmido transformado.

7.1.3. Preparación de células electrocompetentes

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

- i. Partimos de un cultivo saturado de *E. coli*, se inocula 1 litro de LB con los antibióticos necesarios a una DO₆₀₀ inicial de 0,02 y se deja creciendo a 37 °C hasta alcanzar fase exponencial.
- ii. Al llegar a una DO₆₀₀ de 0,6, las células se centrifugan a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- iii. Se resuspenden las células en 200 ml de agua estéril previamente enfriada y se vuelve a centrifugar a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- iv. Las células son lavadas de nuevo en 100 ml de agua estéril y se vuelve a centrifugar a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C
- v. Se vuelve a lavar el pellet, en este caso con 50 ml de 10 % (v/v) glicerol estéril. Se centrifuga y se repite este paso una vez más.
- vi. Finalmente, las células son resuspendidas en 2 ml de 10 % (v/v) glicerol estéril.
- vii. Se hacen alícuotas de 50 μ l y se congelan en nitrógeno líquido. Son conservadas a -80 °C .

7.1.4. Transformación de células electrocompetentes

Las células de *E. coli* guardadas a -80 °C se descongelan en hielo y son transformadas como se describe a continuación:

- i. A una alícuota de 50 µl de células, se le añaden 10-50 ng de plásmido.
- ii. La mezcla se deposita en una cubeta de electroporación (previamente enfriada en hielo) y se electropora aplicando una descarga de 25 µF de capacitancia, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω en el electroporador ECM630 (BTX, Massachusetts, EE.UU).
- iii. Posteriormente la mezcla se transfiere a un tubo de 1,5 ml al que se le añade 1 ml SOC y se incuba a 37 °C durante 3 horas para la recuperación de las células.
- iv. Finalmente, se plaquea el producto de transformación en LB con los correspondientes antibióticos.

7.2. Transformación de *A. rhizogenes*

7.2.1. Preparación de células electrocompetentes

Para hacer células competentes, tanto de *A. rhizogenes* ARqual, se sigue el protocolo descrito por Wise et al., (2006):

- i. 5 ml de LB con los antibióticos necesarios son inoculados y se deja crecer a 28 °C durante 24 horas.
- ii. Desde el cultivo de 5 ml, inoculamos 500 ml de LB suplementado con los antibióticos requeridos, y se deja crecer a 28 °C en agitación hasta alcanzar DO₅₅₀ 0,5 – 0,8.
- iii. Una vez alcanzada esa DO₅₅₀, el cultivo se enfría en hielo. El resto del protocolo debe hacerse en frío, y todo el material a usar, debe estar previamente enfriado.
- iv. Se centrifugan las células a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- v. Las células son resuspendidas cuidadosamente en 10 ml de agua fría estéril y se ajusta el volumen final a 500 ml.
- vi. Repetimos el paso anterior dos veces, resuspendiendo las células en volúmenes decrecientes: 250 ml la primera vez, y 50 ml la segunda.
- vii. Centrifugamos las células a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspenden en 10 ml de 10 % glicerol estéril (v/v).
- viii. Se preparan alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservan a -80 °C hasta su uso.

7.2.2. Transformación de células electrocompetentes

La transformación de células electrocompetentes de *A. rhizogenes* se realiza del mismo modo que se describe en el apartado 7.1.4. para *E. coli*.

7.3. Transformación de *S. cerevisiae*

Para la transformación de levaduras, se usa el método del acetato de litio descrito por (Gietz y Schiestl, 1991):

- i. Una colonia individual crecida en YPD sólido durante 48 horas, se utiliza para crecer un cultivo líquido de 5 ml de YPD durante 16 horas a 28 °C.
- ii. Desde el cultivo ya saturado, se inoculan 10 ml de YPD, de forma que la DO_{600} inicial fuera de 0,1.
- iii. Se crecen a 28 °C en agitación, hasta llegar a una DO_{600} de 0,4.
- iv. Una vez alcanzada esa DO_{600} , las células se sedimentan por centrifugación a 3.000 x g durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, y el sedimento se resuspende en 5 ml de Solución de Litio estéril.
- v. Se centrifugan las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 minutos. Mientras tanto, se hierve el esperma de salmón (10 mg/ml) a 90 °C durante 10 minutos y se pone en hielo.
- vi. Se descarta el sobrenadante, y el sedimento se resuspende en 100 µl de Solución de litio estéril.
- vii. Por cada 60 µl de células se añaden 7 µl de esperma de salmón y el volumen necesario para añadir 0,1-1 µg totales de ADN plasmídico (plásmido cerrado). En el caso de la recombinación homóloga, se le adiciona la amplificación de PCR y el vector en un ratio 7:1 (inserto: vector) o el plásmido cerrado. La mezcla es agitada en vórtex.
- viii. Después, se añaden 0,45 ml de solución PEG estéril y se agita la mezcla.
- ix. Se incuban las células a 30 °C durante 30 minutos.
- x. Se les aplica un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos.
- xi. Se plaquean 200 µl en SD con los suplementos nutricionales requeridos para las auxotrofías de cada cepa y se incuban durante 3-5 días a 28 °C.

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

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

7.4. Transformación de *M. truncatula*

La transformación de plantas de *M. truncatula*, se realiza mediante la infección de plántulas con *A. rhizogenes* ARqual, siguiendo la metodología descrita por (Boisson-Dernier et al., 2001) Tras escarificación y esterilización de las semillas de *M. truncatula*, como se describe en el apartado 1.1, éstas se germinan durante 16-20 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las radículas deben tener una longitud de aproximadamente 1 cm.

- i. En esterilidad, se escinde el ápice radicular (aprox. 3 mm) con la ayuda de un bisturí y la raíz seccionada se arrastra sobre una placa con un césped de *A. rhizogenes* ARqual que contenía el plásmido a transformar.
- ii. Inmediatamente, cada una de las plántulas se transfiere a una placa con medio Fahreaus (Dazzo, 1982), suplementado con el antibiótico de selección en planta según el plásmido (ver Tabla 7) y se cultivan en la cámara de crecimiento *in vitro* a 22 °C y 16 horas de luz durante 21-28 días.
- iii. Tras ese periodo de tiempo, las plantas transformadas son transferidas a macetas de perlita estéril. Consideramos como plantas transformadas, aquellas que presentan crecimiento de raíces laterales sobre el medio Fahreaus suplementado con el antibiótico.
- iv. Para los experimentos de nodulación, las plantas son inoculadas con la cepa que corresponda a cada ensayo de *S. meliloti* a la semana de ser transplantadas. Se vuelve a repetirla inoculación a la semana siguiente. Con esta doble inoculación aseguramos la nodulación.

8. Detección y visualización de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Plántulas de *M. truncatula* fueron transformadas con construcciones con la fusión del gen de la β -glucuronidasa al promotor de interés de estudio. Tras su cultivo en placa, transferencia al invernadero e inoculación, fueron recogidas a los 28 dpi. Posteriormente fueron tratadas de acuerdo al protocolo de (Vernoud et al., 1999) con ligeras modificaciones.

- i. Las raíces y nódulos son recogidos en tubos con 40 ml de Solución GUS al que se le adicionaron 200 μ l de X-GlcA (20 mg/ml). La mezcla se incuba durante 16 horas a 28 °C en oscuridad.
- ii. Transcurrido ese tiempo, se retira la solución y se blanquean las muestras con NaClO (40 mg/ml) durante 5 minutos. A continuación, se realizan 3 lavados con agua. Las muestras se mantienen húmedas con agua.
- iii. Las imágenes de nódulos y raíces fueron tomadas con una lupa Leica MZ10F por medio del programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).
- iv. Posteriormente, se incluyen tanto los nódulos, como las raíces en 6 % (p/v) agarosa y se cortan en secciones de 100 μ m usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU).
- v. Las secciones se observan en un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen,

Alemania) y las imágenes son tomadas usando el programa Leica AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

Solución GUS: 0,69 % NaH_2PO_4 ; 0,2 % EDTA 0.5 M pH 8,0; 0,1 % (v/v) N-lauril-sarkosina, 0,1 % (v/v) Triton X-100).

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

9. Microscopía de campo claro

- i. Nódulos de *M. truncatula* 28 dpi son fijados en una solución con 0,25 % (v/v) glutaraldehído, 4 % (v/v) formaldehído y 2,5 % (v/v) sacarosa en tampón fosfato potásico 0,05M; pH7,4 durante 2 horas a 4 °C.
- ii. Transcurrido ese tiempo se renueva el fijador y se incuba 1 hora y 30 minutos a 4 °C.
- iii. Se realizan 3 lavados con 2,5 % (p/v) sacarosa en 50 mM tampón fosfato potásico pH 7,4 durante 30 minutos a 4 °C.
- iv. Los nódulos se deshidratan usando series crecientes de etanol al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (v/v) en 2,5 % (p/v) sacarosa en 50 mM tampón fosfato potásico pH 7,4 durante 10 minutos a 4 °C.
- v. Empleamos 96 % (v/v) etanol en tampón de fosfato potásico 50 mM pH 7.4 con 2,5% (p/v) sacarosa durante 30 min a 4 °C.
- vi. Para el último paso de deshidratación se incuban los nódulos en 100% etanol durante 1 hora a 4°C.
- vii. Durante 3 horas se mantienen los nódulos en 25 % (v/v) Resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) en etanol a 4 °C con agitación.
- viii. Los nódulos se trasladan a 50 % (v/v) Resina LR-White en etanol a 4 °C con agitación durante 16 horas.
- ix. Después, los nódulos se incuban en 75 % (v/v) Resina LR-White en etanol a 4 °C con agitación por 3 horas.
- x. Las muestras se mantienen en Resina LR-White durante 24 horas a 4 °C con agitación.
- xi. Los nódulos son cargados en cápsulas de gelatina rellenas con Resina LR-White y se polimerizaron a 60 °C durante 24 horas.

Tras la polimerización las muestras son cortadas en secciones de 0,5 mm utilizando un ultramicrotomo Reichert Ultracut (Leica, Vienna, Austria) en el Centro Nacional de Microscopia Electrónica (Universidad Complutense de Madrid, España).

Las secciones son teñidas con 1 % azul de toluidina y se observan con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Las imágenes se toman con una cámara digital acoplada al microscopio Leica DFC 420C, Heerburgg, Switzerland).

10. Microscopía confocal

Plántulas de *M. truncatula* fueron transformadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4. Las regiones genómicas, incluyendo unas 2 Kb del promotor de los genes de estudio, fueron introducidas en los plásmidos pGWB4 y pGWB13, fusionando en el extremo C-terminal del inserto la proteína GFP y/o tres epítomos HA (hemaglutinina) respectivamente. Tras 28 dpi, se recogieron raíces y nódulos de estas plantas transformadas, y se siguieron los siguientes pasos:

10.1. Fijación, inclusión y corte de muestras

- i. Las muestras se fijan en la Solución de Fijación durante 16 horas a 4 °C en agitación.
- ii. Transcurrido ese tiempo, se elimina el tampón de fijación y se lavan las muestras con PBS.
- iii. Posteriormente, los nódulos y las raíces son incluidos en un 6 % (p/v) agarosa en agua y se cortaron en secciones de 100 µm usando un vibratomo 1000 plus (St. Louis, MO, EEUU). Éstas se depositaron en portaobjetos de polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), sobre el cual se realizó la inmunohistoquímica.

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

PBS: 0,8 % (p/v) NaCl; 0,02 % (p/v) KCl; 0,144 % (p/v) Na₂HPO₄; 0,024 % (p/v) KH₂PO₄.

Ajustar pH 7,4

En el caso de las plantas transformadas con pGWB4, tras hacer las secciones en el vibratomo y un tratamiento con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1-5 µg/ml, concentración final) durante 15 minutos y un lavado de 5 minutos, las muestras, conservadas en agua, ya están preparadas para su observación en el microscopio de confocal. En el caso de las plantas transformadas con pGWB13, que fusiona tres colas de HA al gen de trabajo, se requiere un tratamiento inmunohistoquímico que se detalla a continuación.

10.2. Inmunohistoquímica de muestras para confocal

- i. Las muestras son deshidratadas usando series crecientes de metanol al 30 %, 50 %, 70 % y 100 % (v/v) en PBS durante 5 minutos en cada paso.
- ii. Posteriormente, los cortes se rehidratan con las mismas concentraciones de metanol, pero en serie decreciente, 70 %, 50 %, 30 % (v/v) y finalmente PBS, durante 5 minutos cada serie.
- iii. Permeabilizar las paredes celulares con 4 % (v/v) celulasa (Onozuka) en PBS, durante 1 hora. Para inactivar la enzima se usa 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 15 minutos.

- iv. Se lavan los cortes con PBS durante 10 minutos y se bloquean con 5 % (p/v) de BSA (albumina de suero bovino) en PBS, durante 30 minutos.
- v. Tras retirar la solución de bloqueo, las muestras son incubadas, durante dos horas, con una dilución 1:40 en PBS del anticuerpo primario, en este caso, un anticuerpo monoclonal anti-HA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU).
- vi. Después, se lavan las secciones tres veces con PBS (15 minutos cada lavado).
- vii. A continuación, incubamos las muestras durante una hora, con una dilución 1:50 en PBS del anticuerpo secundario, en este caso, se trataba de un anticuerpo anti-ratón producido en conejo, y conjugado al fluoróforo Alexa 594 (Thermofisher).
- viii. Lavamos 3 veces durante 15 minutos con PBS.
- ix. Teñir el ADN de las secciones en 1-5 µg/ml DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)
- x. Por último, se lava el exceso de DAPI con agua destilada durante 5 minutos. Las muestras son conservadas en agua hasta su observación en microscopio confocal.

10.3. Observación y obtención de imágenes con microscopio confocal

Una vez tenemos las muestras preparadas, se observan en un equipo confocal Leica SP8, compuesto por un microscopio Leica DMI 6000 y una lámpara de fluorescencia EL6000 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes, se visualizan a través del programa Leica AX (Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones son excitadas a 488 nm para el GFP (verde), y 561 nm para el Alexa 594 (rojo). Para excitar el DAPI (azul) se emplea UV. La fluorescencia emitida se recoge desde 500-550 nm para GFP, de 600-660 nm en el caso del Alexa 594, y entre 420-490 nm en el caso del DAPI. Las imágenes captadas son montaron y procesadas usando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

11. Microscopía electrónica de Transmisión (MET)

Plántulas de *M. truncatula* fueron transformadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4. Nódulos de plantas transformadas con el vector pGWB13 que fusiona 3 epítomos de HA en el extremo C-terminal del inserto. En este caso el inserto se trata de la región que va desde 2 kb aguas arriba del codón de inicio del gen de interés hasta el penúltimo codón de la región transcribible (sin el codón de parada). Tras 28 dpi, se recogieron raíces y nódulos de estas plantas transformadas, y se siguieron los siguientes pasos:

11.1. Inclusión de muestras en LR-White

Primer paso: fijación

- i. Los nódulos recién recogidos son fijados en Solución de Fijación para Inmunolocalización en MET durante 2 horas a 4°C.

- ii. Después se renueva el fijador y se deja otras 1,5 horas fijando a 4°C.
- iii. Tras la fijación, hacemos dos lavados con 2,5 % (p/v) sacarosa 2,5 % (p/v) en 50 mM tampón fosfato potásico durante media hora cada uno a 4°C.
- iv. Se realiza un tercer lavado con el mismo tampón a 4°C que dejamos durante la noche.

Solución de fijación para inmunolocalización en MET: 1 % (p/v) paraformaldehído; 0,5 % (p/v) glutaraldehído; 3 % (p/v) sacarosa en buffer fosfato potásico 0,05 M. Ajustar pH 7,4

Segundo paso: Deshidratación e infiltración con LR-White

- i. Se incuban las muestras en soluciones seriadas de etanol de etanol al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (v/v) disueltas en tampón fosfato potásico 50 mM con 2.5 % (p/v) sacarosa a 4°C durante 10 minutos cada una.
- ii. Se incuba en etanol 96 % (v/v) disuelto en tampón fosfato potásico 50 mM con 2.5 % (p/v) sacarosa a 4°C durante media hora.
- iii. Se hacen dos incubaciones en 100 % etanol disuelto en tampón fosfato potásico 50 mM con 2.5 % (p/v) sacarosa a 4°C de una hora cada una.

Una vez deshidratadas las muestras comienzan a incubarse en soluciones de menos a más concentradas de la resina LR-White (London Resin Company Ltd, UK) diluida en 100 % etanol para la infiltración de la resina en la muestra.

- i. Incubamos con una mezcla 1:3 LR-White y 100 % etanol durante 3 horas a 4°C en agitación.
- ii. Aumentamos la relación LR-White y 100 % etanol a 1:1 e incubamos a 4°C en agitación durante la noche o el fin de semana
- iii. Incubamos las muestras en una mezcla 3:1 LR-White y 100 % etanol a 4°C en agitación durante 3 horas.
- iv. Repetimos el paso, en este caso con LR-White pura, también a 4°C en agitación durante la noche o el fin de semana
- v. Las muestras se cargan en cápsulas de gelatina rellenas con LR-White y se polimerizan a 60°C durante 24 horas.

11.2. Corte de muestras para microscopía electrónica

Los cortes de 1 µm de grosor fueron preparados en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Madrid) con un Reichert Ultracut S-ultramicrotomo equipado con una cuchilla de diamante y colocadas en rejillas de cobre específicas para MET.

11.3. Inmunohistoquímica de muestras para MET

- i. Las muestras fueron bloqueadas con 2 % (p/v) BSA en PBS, 30 minutos.
- ii. Se incuban con anticuerpo monoclonal Anti-HA producido en conejo (Sigma) a 1:20 en PBS durante tres horas.
- iii. Se realizan 10 lavados de dos minutos en PBS.
- iv. Se incuban con anticuerpo anti-conejo conjugado a una partícula de oro de 15 nm durante a 1:150 en PBS 1 hora.
- v. Lavamos 15 veces en PBS durante dos minutos.
- vi. Lavamos 10 veces en agua durante dos minutos.
- vii. Posteriormente, las secciones fueron teñidas con 2 % (p/v) acetato de uranilo.

11.4. Observación y captura de imágenes en MET

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico JEM 1400 a 80kV con la asistencia del Centro Nacional de Microscopía electrónica (Madrid).

12. Determinación de 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 son enviadas a la Unidad de Análisis de Metales de la Universidad de Barcelona, para medida de Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

13. Medida de la actividad nitrogenasa

La medida de actividad nitrogenasa fue llevada a cabo a cabo usando el método de reducción de acetileno, descrito por Hardy *et al.*, (1968).

- i. Raíces y nódulos de 4-6 plantas de 28 dpi seleccionadas al azar, se introducen en viales de 30 ml cerrados con tapones de goma.
- ii. Un décimo del volumen de aire del vial (3ml) es reemplazado por el volumen equivalente de acetileno.
- iii. Las muestras son incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- iv. Transcurrido ese tiempo, se toman muestras de 0,5 ml por triplicado, y se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-8, con una columna Porapak N. El valor del de etileno producido, se determina midiendo la altura en mV, del pico de etileno respecto a la línea base, con valor 0.
- v. La medida de actividad nitrogenasa se representa en nmol de etileno por hora y gramo de

nódulo/ número de plantas, calculado a partir de la siguiente fórmula:

Donde,

Cst = Concentración del estándar

Metst = Medida de etileno para el estándar

Vt = Volumen total del vial utilizado

Metmuestra = Medida de etileno para una muestra

mnod = masa de nódulos

Vmuestra = Volumen de muestra medido

14. Determinación de la formación de unidades de colonia

Nódulos frescos de *M. truncatula* de 28 dpi fueron recogidos de la planta. Para determinar la formación de unidades de colonia se sigue el método descrito por Montiel y colaboradores (Montiel et al., 2016).

- i. Los nódulos son esterilizados en 10 % (v/v) etanol durante 10 minutos.
- ii. Se realizan 5 lavados con agua destilada estéril.
- iii. El tejido es molido con un micropistilo en 200 µl de TY.
- iv. Diluciones seriadas del homogenado son plaqueadas en medio sólido TY.
- v. Tras ser incubadas 48h a 30 °C el número de colonias es contabilizado.

15. Inducción, detección y purificación de proteínas

15.1. Inducción de la expresión de proteínas en cultivos de *E. coli*

La inducción de la expresión de proteínas se realizó en medio 2xYT, apartado 2.3.6. Se recuperarán muestras de 1 ml de cultivo antes y después de la inducción para comprobar la expresión por Western blot, apartado 15.2. En este caso, las cepas inducidas son *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que han sido transformadas con el plásmido pET16b que introduce dos etiquetas de estreptavidina en el extremo 5' del gen insertado. El sistema tiene un promotor inducible por lactosa.

- i. A partir de un cultivo saturado previo, inoculamos a una DO_{600} de 0,1 con la cepa inducible de interés.
- ii. A una DO_{600} de 0.7, se añade al cultivo 1mM IPTG.

- iii. Tras 3 horas de inducción a 37 °C las células son sedimentadas y congeladas a -80 °C hasta su uso.

15.2. Detección de proteínas por Western blot

Para la detección de proteínas se usa la técnica Western blot, como se describe a continuación.

15.2.1. Electroforesis de proteínas y tinción del gel

A partir de un sedimento de 1 ml cultivo inducido de *E. coli*, se homogeneizan las muestras a una DO_{600} de 4, resuspendido en tampón de carga Laemmli (Laemmli, 1970). Tras ser hervidas a 95 °C durante 5 minutos, se cargan 10 µl de cada muestra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) preparados con una zona de enfoque (4 % (v/v) poliacrilamida) y una zona de separación (12 % (v/v) acrilamida).

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

Tampón de carga Laemmli: 1 M Tris-HCl pH6.8, 2 % (v/v) β-mercaptoetanol, 20 % (v/v) glicerol, 0,2 % (p/v) azul de bromofenol.

Gel condensador: 4 % (v/v) acrilamida-bisacrilamida solución 30 %, 25 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 % (v/v) SDS, 0.1 % (v/v) 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) SDS, 0.5 % (v/v) TEMED, 0.04 % (v/v) Persulfato amónico (APS).

Tampón de electroforesis desnaturalizante: 192 mM glicina, 25 mM Tris, 0.1 % (p/v) SDS

15.2.2. Electrotransferencia de proteínas

Una vez separadas por SDS-PAGE las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm empleando el sistema Transfer-Blot® Semi Dry system (Bio-Rad) (BioRad, Hercules, CA, EEUU). 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.

Tampón de transferencia: 192 mM Glicina, 25 mM Tris-HCl.

15.2.3. Inmunodetección de proteínas

Para la inmunotinción de proteínas con epítopos de estreptavidina usamos anticuerpos de Strep-tactina. Seguimos los siguientes pasos:

- i. Bloqueamos la membrana de nitrocelulosa con 20 ml de 10 % (p/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 en tampón PBS durante un mínimo de 4 horas. Podemos dejar la membrana bloqueando a 4 °C durante la noche. Es muy importante no usar leche para bloquear la membrana, pues nuestro anticuerpo se une a proteínas biotiniladas.
- ii. Se lava la membrana 3 veces en PBS con 0,1 % (v/v) Tween 20 durante 5 minutos cada uno.
- iii. Se añaden 10 ml de PBS con 0,1 % (v/v) Tween 20 a la membrana y añadimos 10 µl del buffer bloqueante de biotina (IBA Lifescience) e incubamos durante 10 minutos (este segundo bloqueo ayuda a prevenir la detección de proteínas biotiniladas de *E. coli*).
- iv. Se lava la membrana con 20 ml de PBS durante 1 minuto.
- v. Añadimos 10 ml del anticuerpo de Strep-tactina HRP conjugado (IBA Lifescience) (1:10000 en PBS) e incubamos la membrana durante 30 minutos.
- vi. Se realizan dos lavados en PBS con 0,1 % (v/v) Tween 20 de 1 minuto.
- vii. Se realizan dos lavados con PBS de 1 minuto.
- viii. La detección se llevó a cabo en empleando el sustrato ECL (Sigma-Aldrich) para el revelado de Western blot.

15.3. Purificación de proteínas

A partir de un cultivo inducido (apartado 17.1) de *E. coli* para la proteína a sobreexpresar, se realizaron los siguientes pasos para purificación de la misma. Se destaca que en este trabajo las proteínas usadas van fusionadas a epítopos de estreptavidina (apartado 15.1) , por lo que se usan kits específicos para este (IBA, Lifesciences):

- i. El cultivo fue sedimentado y resuspendido en el tampón A suplementado con 1 mM PMSF, 1 µg/ml de leupeptina y 5 µg/ml DNAsa I.
- ii. Las células fueron lisadas en la “French pressure cell press” Emulsilex-C5 homogenizer (Avestin Inc.).
- iii. El extracto obtenido fue separado en ultracentrífuga a 50,000 x g durante 1h a 4 °C y posteriormente filtrado a través de un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro (Nalgene Rapid-Flow, Thermo Scientific) con la intención de obtener la fracción soluble, libre de membranas.
- iv. Una vez tenemos la fracción soluble del cultivo de *E. coli*, pasamos a la purificación de la

proteína en sí. Para ello antes de cargar el extracto crudo, la columna es equilibrada con tampón B. Se usa la resina Strep-Tactin® Superflow® 50 % suspensión (IBA Lifesciences)

- v. Antes de cargar el extracto crudo se ajusta el pH 7,5.
- vi. Se cargan 10 µl del extracto crudo en la columna.
- vii. Realizamos 5 lavados de 15 ml de tampón B cada uno.
- viii. Para la elución añadimos 12 ml de tampón B suplementado con 50 mM destiobiotina.
- ix. Para desalar la purificación fueron usados HiPrep 26/10 Desalting column (GE Healthcare).
- x. Una vez desalada, la proteína es cuantificada mediante el método Bradford y conservada a -80 °C en buffer B.

Tampón A: 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol.

Tampón B: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol.

15.4. Cuantificación de proteínas mediante Bradford

La cuantificación de proteína en un volumen concreto se realiza siguiente el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Se cuantifican entre 2-20 µl de la suspensión de nuestra proteína a la que se añade Bradford Reagen (Sigma-Aldrich) hasta 1 ml de volumen total. Se midió la DO595 en un espectrofotómetro de luz UV/visible Ultrospect 3300 pro (Amersham Bioscience). Los valores de nuestras medidas se extrapolan en una recta patrón realizada a partir concentraciones conocidas de BSA, de 0,2 a 1 mg/ml que ha sido preparada simultáneamente.

16. Determinación de unión y afinidad a cobre

Para determinar si se da unión de cobre con una proteína dada y su afinidad, se realiza el siguiente ensayo bioquímico de competición con ácido bicinconínico (BCA). Siguiendo la formación del complejo CuBCA₂ a 355 nm podemos determinar la constante de disociación (K_D). Es una modificación del protocolo descrito por Brenner y Harris, 1995, al que se ha añadido le añaden pequeñas modificaciones para trabajar con bajas cantidades de proteína en volúmenes pequeños (0,1-1ml) (Brenner y Harris, 1995). El experimento consiste en usar BCA para medir la cantidad de cobre unido por la proteína. Tras añadir una concentración conocida de ésta, se añade un desnaturizante que libera el cobre y posteriormente una solución con BCA que forma el complejo BCA-Cu(I) de color rosado cuyo pico de absorbancia es detectado a 354,5 nm. Así pues:

- i. Añadimos de 1 a 20 mM de la proteína purificada de interés, ajustamos a 55 mM.
- ii. Preparamos una curva estándar de cobre usando 50 mM de CuCl₂ preparado en el mismo tampón en el que la proteína está suspendida.

- iii. Añadimos el buffer a cada tubo hasta un total de 55 mM. Vorteamos.
- iv. Se añaden 18,3 mM de TCA (ácido tricloracético) al 30 % (v/v). Vorteamos.
- v. Centrifugamos a 10.000 x g, durante 10 minutos.
- vi. Retiramos 66 mM del sobrenatante evitando no llevar el pellet de la proteína,
- vii. Añadimos 5 mM de ácido ascórbico 4 mM preparado fresco. Vorteamos.
- viii. Añadimos 29 mM de la Solución de BCA, vorteamos y se deja incubando 5 minutos a temperatura ambiente.
- ix. Se recoge el espectro de absorción a 355 nm

Solución BCA: 350 mM BCA, 1,8 M NaOH, 1,3 M Hepes.

El cálculo de la constante de afinidad a cobre se realiza mediante un ensayo de competición con BCA, también por colorimetría. El experimento se realizó a 20 mM de BCA y 100 mM de nuestra proteína, en tampón Hepes. y se tituló con Cu^+ , determinando la DO_{360} . Los valores se usan para determinar el Cu^+ libre del equilibrio $\text{Cu}^+ + 2\text{BCA} \leftrightarrow \text{Cu}^+\text{BCA}_2$ usando la K_a de BCA de $4.60 \times 10^{14} \text{ M}^{-2}$ y un coeficiente molar de extinción $\epsilon_{360} = 20,600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. La afinidad de equilibrio Cu^{++} MtATX1 « CuMtATX1 se calcula usando la diferencia de Cu^+ libre y se modeló usando la ecuación $[\text{BCA}_2 \cdot \text{Cu}^+]/[\text{BCA}_{\text{libre}}]^2[\text{Cu}^+_{\text{libre}}]$ (Yatsunyk y Rosenzweig, 2007, González-Guerrero y Argüello, 2008) mediante el software Origin (OriginLab).

Tampón Hepes: 50 mM Hepes, 200 mM NaCl, 200 mM ácido ascórbico.

17. Bioinformática

17.1. Comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Para los estudios de similitud de los miembros de las familias de las proteínas de estudio, se han realizado búsquedas tipo BLASTP en el *M. truncatula* Genome Project site (<http://www.jcvi.org/medicago/index.php>). Las secuencias de proteínas homólogas de otros organismos, fueron obtenidas de Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>), del National Center for Biotechnology Information NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) y del The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org>). Fueron alineadas usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para la construcción de los árboles filogenéticos fue usado MEGA7, en el que fue empleado un algoritmo Neighbour Joining. FigTree fue utilizado (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para la visualización de los mismos. En la siguientes tablas se recogen todas las secuencias usadas.

Tabla 8. Secuencias utilizadas para el árbol filogenético de la familia MTP

Nombre	Organismo	Número de Acceso	Sustrato	Referencias
MtMTP1	<i>M. truncatula</i>	Medtr8g024240	Zn	Chen <i>et al.</i> , 2009
MtMTP2		Medtr4g064893		
MtMTP3		Medtr2g036390		
MtMTP4		Medtr3g080090		
MtMTP5		Medtr7g093290		
MtMTP6		Medtr1g088870		
MtMTP7		Medtr4g008150		
MtMTP8		Medtr3g062610		
MtMTP9		Medtr2g064405		
MtMTP10		Medtr8g046550		
MtMTP11		Medtr7g022890		
MtMTP12		Medtr6g463330		
MtMTP13		Medtr5g075680		
AtMTP1	<i>A. thaliana</i>	At2g46800	Zn	Kobae <i>et al.</i> , 2004; Desbrosses-Fonrouge <i>et al.</i> , 2005, Kawachi <i>et al.</i> , 2008
AtMTP2		At3g61940		
AtMTP3		At3g58810	Zn, Co	
AtMTP4		At2g29410		Arrivault <i>et al.</i> , 2006
AtMTP5		At3g12100	Zn	
AtMTP6		At2g4783		Fujiwara <i>et al.</i> , 2015
AtMTP7		At1g51610		
AtMTP8		At3g58060	Mn, Fe	Eroglu <i>et al.</i> , 2017
AtMTP9		At1g79520		
AtMTP10		At1g16310		Delhauze <i>et al.</i> , 2007; Peiter <i>et al.</i> , 2007
AtMTP11		At2g39450	Mn, Co	
AtMTP12		At2g04620	Zn	Fujiwara <i>et al.</i> , 2015
OsMTP1	<i>O. sativa</i>	Ay266290	Zn, Co, Ni, Fe, Cd	Lan et al 2012; yuan et al 2012, Menguer et al, 2013
OsMTP8		Ap014959	Mn	
CsMTP1	<i>Cucumis sativus</i>	Ef684941	Zn, Cd	Migocka <i>et al.</i> , 2015
CsMTP4		Jq618097	Zn, cD	Migocka <i>et al.</i> , 2015
CsMTP8		Jq618099		Migocka <i>et al.</i> , 2014
CsMTP9		Jq618098	Mn, Cd	Migocka <i>et al.</i> , 2015
AhMTP1-A		Aj556183	Zn	Drager <i>et al.</i> , 2004; Shahzad <i>et al.</i> , 2010

Tabla 8 (continuación). Secuencias utilizadas para el árbol filogenético de la familia MTP

Nombre	Organismo	Número de Acceso	Sustrato	Referencias
AhMTP1-B	<i>A. halleri</i>	Fn386317	Zn	Shahzad <i>et al.</i> , 2010
AhMTP1-C		Fn386316	Zn	Shahzad <i>et al.</i> , 2010
AhMTP1-D		Fn386315	Zn	Shahzad <i>et al.</i> , 2010
HvMTP1	<i>Hordeum</i>	Am286795	Zn	Podar <i>et al.</i> , 2012
HvMTP8.1	<i>vulgare</i>	Jx051321	Mn	
PtdMTP1	<i>P. trichocarpa</i> <i>x deltooides</i>	Ay450453	Zn	Blaudez <i>et al.</i> , 2003; Montanini <i>et al.</i> , 2007
PtMTP11.1	<i>P. trichocarpa</i>	Ef453693	Mn	Peiter <i>et al.</i> , 2007
PtMTP11.2		Ef453694	Mn	Peiter <i>et al.</i> , 2007

Tabla 9. Secuencias utilizadas para el dendrograma de metalochaperonas.

Nombre	Número de Acceso	Nombre	Número de Acceso
MtATX1	Medtr3g111350	AtCCS1	At1g12520
Medtr4g101820	Medtr4g101820	AtATOX1	At1g66240
Medtr7g013660	Medtr7g013660	AtCCH	At3g56240
Medtr1g092670	Medtr1g092670	AtHIPP02	At5g26690
Medtr4g133900	Medtr4g133900	AtHIPP03	At5g60800
Medtr5g097550	Medtr5g097550	ATHIPP04	At1g29000
Medtr1g078090	Medtr1g078090	AtHIPP05	At2g36950
Medtr4g094280	Medtr4g094280	AtHIPP06	At5g03380
Medtr4g062450	Medtr4g062450	AtHIPP07	At5g63530
Medtr6g086020	Medtr6g086020	AtHIPP08	At3g02960
Medtr6g086020	Medtr6g086020	AtHIPP09	At5g24580
Medtr7g108560	Medtr7g108560	AtHIPP20	At1g71050
Medtr1g082650	Medtr1g082650	AtHIPP21	At5g17450
Medtr1g083310	Medtr1g083310	AtHIPP22	At1g22990
Medtr7g100450	Medtr7g100450	AtHIPP23	At4g39700
Medtr1g067560	Medtr1g067560	AtHIPP24	At4g08570
Medtr7g113110	Medtr7g113110	AtHIPP25	At4g35060
Medtr2g095480	Medtr2g095480	AtHIPP26	At4g38580
Medtr4g057765	Medtr4g057765	AtHIPP27	At5g66110
Medtr8g010540	Medtr8g010540	AtHIPP32	At3g06130
Medtr5g069180	Medtr5g069180	AtHIPP33	At5g19090
Medtr2g026685	Medtr2g026685	AtHIPP34	At3g05220
Medtr3g099040	Medtr3g099040	AtHIPP35	At1g56210
Medtr3g099030	Medtr3g099030	AtHIPP36	At5g27690

Tabla 9 (continuación). Secuencias utilizadas para el dendrograma de metalochaperonas.

Nombre	Número de Acceso	Nombre	Número de Acceso
Medtr8g096700	Medtr8g096700	AtHIPP37	At1g23000
Medtr3g435930	Medtr3g435930	AtHIPP43	At3g05920
Medtr1g107565	Medtr1g107565	AtHIPP44	At4g10465
Medtr1g107565	Medtr1g107565	AtHIPP45	At3g56891
Medtr1g063210	Medtr1g063210	AtNARK1	At5g02600
Medtr0041s0140	Medtr0041s0140	AtNARK2	At2g37390
Medtr7g101930	Medtr7g101930	AtNARK3	At3g53530
Medtr2g436830	Medtr2g436830	At1g51090	At1g51090
Medtr4g119820	Medtr4g119820	At1HIPP28	At1g06330
Medtr4g117220	Medtr4g117220	At1HIPP29	At1g29100
Medtr4g117140	Medtr4g117140	At2g18196	At2g18196
Medtr2g022240	Medtr2g022240	At2g28660	At2g28660
Medtr2g022250	Medtr2g022250	At3g13140	At3g13140
Medtr5g020960	Medtr5g020960	At3g21490	At3g21490
Medtr5g055020	Medtr5g055020	At3g24450	At3g24450
Medtr3g117890	Medtr3g117890	At4g15562	At4g15562
Medtr4g073040	Medtr4g073040	At4g23882	At4g23882
Medtr5g022620	Medtr5g022620	At5g05365	At5g05365
Medtr3g073670	Medtr3g073670	At5g37860	At5g37860
Medtr3g087770	Medtr3g087770	At5g50740	At5g50740
Medtr8g091420	Medtr8g091420	Medtr6g003990	Medtr6g003990
Medtr5g025150	Medtr5g025150	Medtr6g026890	Medtr6g026890
Medtr1g030630	Medtr1g030630	Medtr2g091235	Medtr2g091235
Medtr7g083060	Medtr7g083060	Medtr4g120750	Medtr4g120750

17.2. Representación tridimensional de estructuras protéicas

Las secuencias de los moldes usados para hacer los modelos de las proteínas estudiadas se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). El modelaje de la proteína se realizó con los programas SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Biasini et al., 2014) e I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang et al., 2015) y visualizado con MacPyMOL 2.1 (Schörlindegger LLC, EE.UU).

17.3. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados, se diseñaron con ayuda de las siguientes herramientas bioinformáticas:

1) Descarga de secuencias

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

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

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

2) Análisis de secuencias

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

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

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

3) Diseño y análisis de oligonucleótidos

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

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

17.4. Análisis estadísticos

Para la comparación entre dos varianzas muestrales se utilizó la prueba t de Student (Senn y Richardson, 1994). Para la comparación entre varianzas muestrales múltiples se utilizó el método Tukey (Tukey, 1949). Los resultados con p-valores menores de 0.05 se han considerado estadísticamente significativos.

Resultados

MtMTP2

1. MtMTP2

En la búsqueda de un transportador encargado de importar zinc al bacteroide, se tuvieron en cuenta miembros de familias cuya dirección de transporte de metal sea del citosol al apoplasto o al lumen. Entre éstas, los CDF/MTP y las P_{1b} -ATPasas parecen las mejores candidatas, pues muchos miembros de la familia han sido descritos como transportadores de metales divalentes que redistribuyen sus sustratos a distintos compartimentos celulares como la vacuola, retículo endoplasmático, aparato de Golgi o a los distintos compartimentos de mitocodrias o cloroplastos (Argüello et al., 2009; Ricachenevsky et al., 2013).

Asumiendo que un gen con un perfil de expresión específico o inducido en nódulo probablemente esté desarrollando de un papel importante en la FSN, se acudió a diferentes bases de datos públicas para acotar la búsqueda. Mientras que en la familia de las Zn^{2+} -ATPasas no aparece ningún miembro con un perfil de expresión diferenciado que se vea inducido en el nódulo, sí fue así en el caso de la familia CDF/MTP.

1.1. MtMTP2 presenta un máximo de expresión en nódulo

Se han identificado 13 miembros de la familia CDF/MTP en el genoma de *M. truncatula* mediante comparación de secuencias a partir de MTPs de referencia de *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *O. sativa*, *H. vulgare* y *C. sativus*. En una primera aproximación, fueron analizados los niveles de expresión de estos genes en las bases de datos públicas de “*Medicago truncatula* Gene Expression Atlas” (MtGEA) <https://mtgea.noble.org> que incluye varios trabajos que recogen la expresión en todos los órganos, tiempos de desarrollo y bajo distintos estreses (Benedito et al., 2008). Se observó que *MtMTP2* (*Medtr4g064893*) presentaba los mayores niveles de expresión en nódulo de los 13, especialmente si se compara con la expresión de la raíz (Figura 5A). Datos similares se obtuvieron cuando se consultó la base de datos “Symbimics” <https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>, que aporta información sobre la expresión en raíz y nódulo. Symbimics tiene la peculiaridad de proporcionar la información transcriptómica tanto de *M. truncatula* como de *S. meliloti* en las diferentes zonas de desarrollo de los nódulos de la planta, ya que éstos fueron microdisecccionados por láser permitiendo analizar los transcritos de cada región independientemente (Roux et al., 2014) (Figura 5B).

Esta información ha sido validada experimentalmente mediante ensayos de qRT-PCR usando material obtenido en nuestro laboratorio. Observamos como los niveles de expresión relativa de *MtMTP2* son al menos 5 veces más altos en nódulo que en raíces y parteas aéreas ya sea cuando las plantas han sido inoculadas con *S. meliloti* (condiciones simbióticas a 28 dpi) o cuando se aplica nitrógeno en la solución de riego en forma de nitrato amónico (condiciones no simbióticas) (Figura 5C).

Figura 5. Expresión de la familia MTP en *M. truncatula* en diferentes órganos. **(A)** Datos obtenidos de la base de datos *M. truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA). **(B)** Datos obtenidos de la base de datos Symbimics. **(C)** Expresión del transcrito de *MtMTP2* en la parte aérea y raíz de plantas fertilizadas con nitrógeno, y parte aérea, raíz y nódulo de plantas en condiciones simbióticas a 28 dpi. Relativizado al gen estándar de la *Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa*. Los datos son las medias de al menos tres experimentos independientes $\pm$ SD. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$).

1.2. MTP2 es miembro de la familia *Metal Tolerance Protein* (MTP)

La familia MTP se distribuye en 7 clados, basándose en similitud de secuencia. Estos clados corresponden con los putativos sustratos de metal que transportan (Ricachenevsky et al., 2013). Para ganar información acerca del posible sustrato de transporte de MtMTP2 se compararon las secuencias de los 13 transportadores MTP de *M. truncatula* y homólogos de *A. thaliana*, *O. sativa*, *C. sativus*, *A. halleri*, *P. trichocarpa* y *H. vulgare*. MtMTP2 se sitúa en el primer clado (Grupo 1) que Ricachenevsky y colaboradores (2013) propusieron, formado por transportadores vacuolares de zinc. MtMTP2 tiene una fuerte similitud con CsMTP4 (54%) y AtMTP4 (48%). El primero de estos ortólogos ha sido descrito como proteína envuelta en la homeostasis de zinc en pepino, el segundo se predice como transportador de zinc de *A. thaliana* (Waters y Grusak, 2008) (Figura 6).

Figura 6. Dendrograma de miembros de la familia MTP. Las secuencias de proteínas homólogas de otros organismos, fueron obtenidas de Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>), del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) y del The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org>)

El modelado de la estructura tridimensional de MtMTP2 también apoya un papel en la homeostasis de zinc. Para ello se usó como molde la estructura del transportador MTP/CDF YiiP de *E. coli* (Lu y Fu, 2007). Esta proteína es un homodímero en el que cada monómero es capaz de transportar Zn^{2+} . Cada uno tiene un sitio transmembrana capaz de unir metales. Desde este sitio, el catión cruza la bicapa lipídica. Este centro está integrado en YiiP por tres aspartatos y una histidina (D45, D49, H153 y D157) que coordinan el metal de forma tetraédrica (Lu et al., 2009). El modelo obtenido de MtMTP2

muestra que coinciden tres de estos 4 residuos y el que difiere es una sustitución de un aspartato por una histidina (H88, D92, H271 y D275) (Figura 7A). Este cambio no debe afectar al metal coordinado dado que el aspartato es capaz de coordinar los mismos elementos (Kawachi et al., 2012). Para apoyar esta tesis, se alineó y comparó con otros MTP de sustrato zinc publicados y se observó como esta sustitución está conservada en plantas (Figura 7B).

Figura 7. Estructura putativa de MtMTP2 y sus residuos putativos de coordinación de metal. **(A)** Modelo de la estructura terciaria de MtMTP2 y su molde YiiP (PDB ID:3h90). La posición de los aminoácidos que coordinan Zn^{2+} están indicados. **(B)** Alineamiento de las regiones conservadas de los aminoácidos que coordinan metal, señalados en cajas rojas. Las secuencias fueron alineadas usando ClustalW.

1.3. MtMTP2 complementa una cepa mutante deficiente en la detoxificación de zinc

El análisis *in silico* anterior y la información disponible sobre transportadores CDF/MTP (Gupta et al., 2014) hacen esperar que MtMTP2 esté retirando zinc del citosol, ya sea al exterior de la célula o a un orgánulo. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la capacidad de MtMTP2 de restaurar el fenotipo las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *zrc1/cot1*, *ccc1* y *smf1*, defectivas en el transporte de zinc, hierro y manganeso a la vacuola, respectivamente (Figura 8).

ZRC1 y COT1 son transportadores del tonoplasto responsables del almacenamiento de Zn en vacuolas (MacDiarmid et al., 2000). La cepa *zrc1/cot1* es un doble mutante hipersensible al zinc (500 μ M de $ZnSO_4$), es tóxico dado que no puede detoxificarlo eficientemente. Esto limita su crecimiento respecto a la cepa silvestre. Cuando la cepa doble mutante es transformada con un plásmido que expresa

constitutivamente una copia del cDNA de *MtMTP2*, ésta crece de forma equivalente a la parental (Figura 8A). El control de crecimiento sin suplemento de zinc, no muestra diferencias en el crecimiento de las tres cepas. Se deduce así que el zinc como sustrato de transporte de *MtMTP2*.

Dado que se han descrito miembros de la familia MTP con hierro o manganeso como sustratos (Yuan et al., 2012, Migocka et al., 2015), se realizaron ensayos de complementación para el transporte de estos elementos. Para estas pruebas se emplearon por un lado la cepa mutante *ccc1* afectada en el transporte de hierro a la vacuola (Li et al., 2001) y por otro la cepa mutante *smf1* deficiente en el transporte de manganeso al mismo compartimento (Portnoy et al., 2001). En ambos casos, no se produce una restauración del fenotipo silvestre cuando las cepas mutantes son transformadas con un plásmido que expresa constitutivamente el cDNA de *MtMTP2* crecidas a 4 mM de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ o 10 mM de MnCl_2 respectivamente (Figura 8B y Figura 8C), indicando que *MtMTP2* no transporta hierro ni manganeso en estas levaduras.

Figura 8. Ensayo de crecimiento de cepas mutantes de levadura deficientes en el transporte de metal transformadas con *MtMTP2*. **(A)** La cepa DY1457 fue transformada con el plásmido vacío pAMBV, mientras que la doble mutante *zrc1/cot1* fue transformada con pAMBV vacío y con pAMBV::*MtMTP2*. Diluciones seriadas 1:10 de cada transformante fueron incubadas durante 3 días a 28°C en medio SD con los aminoácidos requeridos y 500 μM de ZnSO_4 . El medio sin suplemento de zinc se usó como control positivo. **(B)** La cepa DY150 fue transformada con el plásmido vacío pDR196, mientras que la mutante *ccc1* fue transformada con pDR196 vacío y con pDR196::*MtMTP2*. Diluciones seriadas 1:10 de cada transformante fueron incubadas durante 3 días a 28°C en medio SD con los aminoácidos requeridos y 4 mM de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. El medio sin suplemento de hierro se usó como control positivo. **(C)** La cepa BY4741 fue transformada con el plásmido vacío pDR196, mientras que la mutante *smf1* fue transformada con pDR196 vacío y con pDR196::*MtMTP2*. Diluciones seriadas 1:10 de cada transformante fueron incubadas durante 3 días a 28°C en medio SD con los aminoácidos requeridos y 10 μM de MnCl_2 . El medio sin suplemento de manganeso se usó como de control positivo.

1.4. La expresión de *MtMTP2* se distribuye desde la zona de infección y diferenciación hasta la de fijación de nódulo

Con objeto determinar la distribución de la expresión de *MtMTP2* en nódulos y raíces, un segmento de 889 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de *MtMTP2* fue fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (*gus*). Plantas silvestres de *M. truncatula* R108 fueron transformadas con esta construcción, cultivadas en condiciones simbióticas y recogidas a 28 dpi. La actividad β -glucuronidasa, determinada por el promotor de *MtMTP2* fue detectada en raíces y nódulos (Figura 9A), siendo más intensa desde la zona II de nódulo hasta zonas tempranas de la zona de fijación (Figura 9B). En la raíz, la actividad GUS fue detectada en la epidermis, periciclo y tejido vascular (Figura 9C). Datos de la distribución de la expresión en las diferentes zonas del nódulo proporcionados por Symbimics (Roux et al., 2014) confirman los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 9D).

Figura 9. Distribución de la expresión tisular de *MtMTP2*. (A) Ensayo de expresión mediante el gen reportero *gus*. Raíz y nódulo de 28 dpi transformados con la construcción del promotor de *MtMTP2* fusionado a *gus* (*pMtMTP2::GUS*) en el vector pGWB13. Barra: 1 mm. (B) Ensayo de expresión mediante el gen reportero *gus*. Corte longitudinal de un nódulo de 28 dpi transformado con la construcción *pMtMTP2::GUS* en el vector pGWB13. ZI: zona I; ZII: zona II; IZ: interzona; ZIII: zona III. Barra: 100 µm. (C) Ensayo de expresión mediante el gen reportero *gus*. Corte transversal de una raíz de 28 dpi transformada con la construcción *pMtMTP2::GUS* en el vector pGWB3. Barra: 50 µm. (D) Expresión de *MtMTP2* en diferentes regiones del nódulo. Datos obtenidos de la base de datos Symbimics. ZI: zona I; ZIIp: zona II proximal; ZIIId: zona II distal; IZ: Interzona; ZIII: zona III.

1.5. *MtMTP2* localiza en endomembranas en células de nódulo

La localización subcelular de *MtMTP2* fue determinada fusionando en el extremo C-terminal la proteína GFP o tres epítomos de HA y regulando la expresión con un segmento de ADN de 1961 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de *MtMTP2* hasta el último triplete del gen obviando el codón de stop. Ambas construcciones *pMtMTP2::MtMTP2-GFP* y *pMtMTP2::MtMTP2-HA* respectivamente fueron usadas para transformar plantas silvestres de *M. truncatula* R108 crecidas en condiciones simbióticas con *S. meliloti* que expresan constitutivamente DsRED o GFP. Tras 28 dpi se cosechan las plantas y se determina la localización de *MtMTP2* mediante microscopía confocal (Figura 10). La localización subcelular obtenida usando *MtMTP2-GFP* o *MtMTP2-HA* es consistente con los resultados la distribución de la expresión por el gen GUS descritos previamente. En las plantas transformadas con *pMtMTP2::MtMTP2-GFP* se observa la localización intracelular de la proteína desde la zona de infección y diferenciación a la zona de fijación en nódulos de 28 días-post-inoculación. No se detectó

señal alguna en la zona meristemática (Figura 10A-C). Para alcanzar más detalle se realizaron capturas aumentadas de la región infectada de nódulos de plantas transformadas tanto con MtMTP2-GFP como con MtMTP2-HA en las que se observa la localización intracelular de MtMTP2. Se trata de algún compartimento intracelular pero no es posible discernir la estructura concreta donde localiza (Figura 10D-F y Figura 10G). En raíces, MtMTP2-GFP es detectado en la epidermis y alrededor de la vasculatura (Figura 10H-I), confirmando lo observado en el ensayo promotor-GUS.

Figura 10. Localización celular de MtMTP2 en *M. truncatula*. (A-C) Sección longitudinal de un nódulo de 28 dpi transformado con el inserto *pMTP2::MTP2-GFP* a partir del vector pGWB4 (verde). Las plantas fueron inoculadas con *S. meliloti* 1021 expresando constitutivamente DsRED (rojo). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Barras: 100 μ m. (D-F) Vista aumentada de una región de zona infectada de nódulo a 28 dpi de plantas transformadas con el inserto *pMTP2::MTP2-GFP* en el vector pGWB4 (verde). Las plantas fueron inoculadas con un *S. meliloti* 1021 que expresa constitutivamente DsRED (rojo). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Barra: 25 μ m. (G) Detalle de área infectada de nódulo a 28 dpi transformado con el inserto *pMTP2::MTP2-HA* a partir del vector pGWB13. *MtMTP2-HA* es detectado por la unión del anticuerpo secundario conjugado ALEXA 594 que emite fluorescencia roja (rojo). Las plantas fueron inoculadas con *S. meliloti* 2011 expresando constitutivamente GFP (verde). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Barras: 10 μ m. (H-I) Corte transversal de una raíz a 28 dpi transformada con la construcción *pMtMTP2::MtMTP2-GFP* en el vector pGWB4 (verde), núcleos teñidos con DAPI (azul).

No se detectó fluorescencia bajo las mismas condiciones experimentales usadas, en muestras que no presentaban MtMTP2-GFP (Figura 11A) o cuando el anticuerpo primario anti-HA fue obviado en la inmunotinción en el caso de plantas transformadas con el inserto *pMtMTP2::MtMTP2-HA* (Figura 11B).

Figura 11. Control de autofluorescencia para la emisión de GFP y Alexa 594. **(A)** Corte transversal de un nódulo de *M. truncatula* a 28 dpi inoculado con *S. meliloti* 1021 que expresa constitutivamente DsRED (rojo). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Paneles de izquierda a derecha: canal DAPI, canal DsRED, canal GFP, canal transiluminación. Barras: 100 μ m. **(B)** Corte transversal de un nódulo de *M. truncatula* transformado con *pMtMTP2::MTP2-HA* a 28 dpi. Durante la inmunotinción se obvió el anticuerpo primario. El nódulo fue inoculado con *S. meliloti* 2011 que expresa constitutivamente GFP (verde). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Paneles de izquierda a derecha: canal DAPI, canal GFP, canal Alexa 594, canal transiluminación. Barras: 100 μ m.

1.6. MtMTP2 se localiza en retículo endoplasmático en células infectadas y no infectadas de nódulo de *M. truncatula*

Dado que la microscopía confocal no nos proporciona la resolución precisa de MtMTP2, se recurrió a la microscopía electrónica de transmisión. Puesto que no se puede usar marcador fluorescente, se recurrió a un anticuerpo anti-HA conjugado a partículas de 10 nm de oro coloidal. Este anticuerpo se usa para localizar el epítipo HA fusionado a MtMTP2 de plantas transformadas de 28 dpi. El oro aparece como partículas esféricas electrodensas al microscopio electrónico. En el caso concreto de las muestras de regiones infectadas de nódulo transformadas con MtMTP2-HA se encontraron partículas de oro en estructuras intracitoplasmáticas densas (Figura 12A-C) que otros trabajos describen como retículo endoplasmático (Gavrin et al., 2017). Esta señal se encuentra tanto en células infectadas (Figura 12B) como en las células no infectadas de nódulo (Figura 12C). Contrariamente a lo que hipotetizabamos, MtMTP2 no está asociado a los simbiosomas.

Cuando el anticuerpo primario anti-HA no fue usado en la inmunotinción no se detectaron

partículas de oro en las secciones celulares (Figura 12D).

Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una región infectada de nódulo de *M. truncatula* a 28 dpi que expresa el inserto *pMtMTP2::MtMTP2-HA* inoculado con *S. meliloti 2011* y control negativo de señal. Las partículas de oro conjugadas a MtMTP2 están señaladas con flechas. Bacteroides indicados con asteriscos. (A) visión general de una célula infectada (izquierda) y otra no infectada (derecha). (B) aumento de la célula infectada del panel A. (C) aumento de la región no infectada del panel A. (D) Control negativo sin la incubación del anticuerpo primario anti-HA.

1.7. MtMTP2 se requiere para el desarrollo del nódulo

Con el fin de determinar el papel fisiológico de *MtMTP2*, fueron evaluadas dos líneas insercionales mutantes homocigotas de *MtMTP2*, *mtp2-1* (NF11171) y *mtp2-2* (NF18305) generadas en el Noble Research Institute de Ardmore, Oklahoma, EE.UU (Tadege et al., 2008). La primera presenta la inserción del transposón de *Nicotiana tabacum tnt1* en la región promotora (69 bases aguas arriba del codón de inicio), mientras que *mtp2-2* la contiene en el único exón del gen, en la posición 623 (Figura 13A). Las inserciones provocan una reducción en la expresión en ambas líneas: un 80% menos en el caso de *mtp2-1* y una reducción superior al 99% en el caso de *mtp2-2* (Figura 13B). Atendiendo a estos datos de expresión, fueron designados como mutantes *mtp2* silenciado y noqueado respectivamente. Los fenotipos fueron analizados tanto en condiciones no simbióticas en plantas fertilizadas con nitrato amónico, como en condiciones simbióticas, inoculadas con *S. meliloti*.

En condiciones no simbióticas las plantas de las líneas mutantes no exhiben diferencias ni *de visu* (Figura 13C) ni en la biomasa determinada por peso seco en raíces y partes aéreas respecto a plantas silvestres de *M. truncatula* R108 (Figura 13D).

Figura 13. Fenotipo de los mutantes de *MtMTP2* cultivados en condiciones no simbióticas. **(A)** Posición de la inserción del transposón *tnt1* en la región genómica de las líneas *mtp2-1* y *mtp2-2*. **(B)** Expresión de *MtMTP2* en raíces (negro) y nódulos (blanco) de plantas silvestres, *mtp2-1* y *mtp2-2* relativa al estándar *Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa*. Los valores son la media $\pm$ SD de dos experimentos independientes con al menos 4 plantas cada uno. **(C)** Plantas representativas silvestres, *mtp2-1* y *mtp2-2* crecidas en condiciones no simbióticas fertilizadas con nitrato amónico. Barra: 1 cm. **(D)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea.

Tampoco se detectaron diferencias en plantas cultivadas en condiciones no simbióticas en ausencia zinc ($0 \mu\text{M}$ de ZnSO_4 añadido en solución de riego) y exceso del mismo ($38 \mu\text{M}$ de ZnSO_4 , 100 veces superior a las condiciones de suficiencia de zinc del ensayo estándar) (Figura 14).

Figura 14. Fenotipo de mutantes del gen *MtMTP2* en condiciones no simbióticas cultivados a distintas concentraciones de zinc. **(A)** Plantas representativas silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2* en cada condición. Barra: 1cm **(B)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas en cada condición de cultivo. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD una población de al menos 15 plantas por línea.

Sin embargo, bajo condiciones simbióticas, donde inoculamos con el rizobio y sin aporte mineral de nitrógeno en el riego, las plantas mutantes presentan alteraciones en el crecimiento, la actividad nitrogenasa y la homeostasis de zinc (Figura 15). Los nódulos de los mutantes *mtp2-2* son pequeños, redondos y blancos, contrastando con los alargados, cilíndricos y rosados de los nódulos silvestres (Figuras 15B). Siendo consistente con el fenotipo observado, la biomasa determinada por el peso seco de las plantas se muestra reducida en ambos mutantes (Figura 15C), es más drástica la pérdida de ésta en las partes aéreas, acumulando solo un 36% en el caso de *mtp2-1* y un 55% en el caso de *mtp2-2* comparando con la población silvestre. El peso de raíces disminuye un 20% en ambos mutantes respecto a las plantas silvestres. El mutante silenciado *mtp2-1* presenta un fenotipo intermedio entre silvestre y *mtp2-2*.

Para determinar si el fenotipo alterado es consecuencia un descenso en la actividad nitrogenasa, se realizó la medida de reducción del acetileno (Hardy et al., 1968). En el caso de la línea silenciada mutante, *mtp2-1* sufre una reducción del 60% en la actividad nitrogenasa, mientras que en el caso de *mtp2-2* se reduce más de un 99% (Figura 15D). Este fenotipo se puede deber a la alteración de la cantidad de metal que llega al nódulo. Dado que otros MTPs pueden transportar hierro, y el hierro es cofactor de la nitrogenasa, se podría esperar ver una caída en la cantidad de este metal. Sin embargo, cuando se midió por ICP-MS, no se observan diferencias significativas entre silvestre y mutantes (Figura 15E). No obstante, en cuanto al zinc, sustrato que parece ser transportado por MtMTP2 en los ensayos de levadura, sus niveles se acumulan en los nódulos de *mtp2-2* en un 40% más que en la línea silvestre y *mtp2-1* (Figura 15F).

Figura 14. Fenotipo de los mutantes del gen *MtMTP2* en condiciones simbióticas. **(A)** Plantas representativas de las líneas silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2* crecidas en condiciones simbióticas a 28 dpi. Barra: 1 cm. **(B)** Nódulos representativos de las líneas silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2* a 28 dpi. Barra: 500 µm. **(C)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media ± SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(D)** Actividad nitrogenasa de nódulos a 28 dpi. La reducción de acetileno fue medida en duplicado en 3 sets de una mezcla de 4 plantas cada uno. Los datos son la media ± SD de tres experimentos con al menos 12 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(E)** Contenido de hierro en parte aérea, raíz y nódulo de las tres líneas estudiadas. Los datos son la media ± SD de tres experimentos independientes con la mezcla del material de 10 plantas en cada caso. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(F)** Contenido de zinc en parte aérea, raíz y nódulo de las tres líneas silvestre R108, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Los datos son la media ± SD de tres experimentos independientes con la mezcla del material de 10 plantas en cada caso.

La colección de mutantes *tnt1* de *M. truncatula* no tiene el mismo grado de depuración que la de *Arabidopsis*, por lo que es frecuente que una línea tenga varias inserciones en su genoma (Tadege et al., 2008). De este modo, hay que determinar que el fenotipo observado no se deba a alguna de las otras inserciones. Para esto, se identificaron las líneas segregantes de ambas líneas con los dos alelos silvestres de *MtMTP2* en homocigosis y se realizaron ensayos fenotípicos incluyendo estos segregantes. Así, para cada línea mutante tenemos dos perfiles genéticos en el locus de *MtMTP2* uno homocigoto mutante y otro homocigoto silvestre. Tras el desarrollo del ensayo, no se observaron diferencias entre las líneas segregantes con los alelos silvestres respecto a la línea silvestre, mientras que las plantas segregantes que mantienen la inserción en *MtMTP2* presentan el fenotipo mutante anteriormente descrito (Figura 16)

Figura 16. Fenotipo de las líneas mutantes en el gen *MtMTP2* con sus segregantes silvestres y mutantes en homocigosis para este locus en condiciones simbióticas. **(A)** Plantas representativas de las líneas silvestre y mutantes con sus segregantes silvestre e insercionales de *MtMTP2* crecidas en condiciones simbióticas a 28 dpi. Barra: 1 cm. **(B)** Nódulos representativos de las líneas a 28 dpi. Barra: 500 μ m. **(C)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(D)** Actividad nitrogenasa de nódulos a 28 dpi. La reducción de acetileno fue medida en duplicado en 3 sets de una mezcla de 4 plantas cada uno. Los datos son la media $\pm$ SD de dos experimentos con al menos 12 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$).

En ocasiones, los fenotipos de deficiencia de algún metal causados por la ausencia de un transportador concreto, son restaurados añadiendo exceso del metal (Vert et al., 2002; Sancenon., et al 2004). Al aumentar la concentración, puede forzar su entrada por otros transportadores no específicos. Por otro lado, si el fenotipo observado estuviese siendo causado por toxicidad, el fenotipo observado en las plantas puede ser restaurado cuando éstas son crecidas en deficiencia del sustrato en cuestión. Con la intención de complementar el fenotipo observado en el mutante *mtp2-2*, se realizaron ensayos de crecimiento en un gradiente de zinc. Las plantas fueron cultivadas en condiciones subóptimas (0 μM de ZnSO_4 en riego), control (0.38 μM ZnSO_4) y supraóptimas (38 μM de ZnSO_4). En ninguno de los casos evaluados se observa una recuperación en el fenotipo de biomasa o actividad nitrogenasa (Figura 17).

Figura 17. Fenotipo de la línea *mtp2-2* en condiciones no simbióticas en un gradiente de zinc. **(A)** Plantas representativas de las líneas silvestre y *mtp2-2* crecidas en condiciones simbióticas en gradiente de zinc a 28 dpi. Barra: 1 cm. **(B)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(C)** Actividad nitrogenasa de nódulos a 28 dpi. La reducción de acetileno fue medida en duplicado en 3 sets de una mezcla de 4 plantas cada uno. Los datos son la media $\pm$ SD de dos experimentos con al menos 12 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$).

1.8. La ausencia de *MtMTP2* altera el desarrollo de nódulos y bacteroides

El menor tamaño de los nódulos del mutante *mtp2-2* indica una alteración en el desarrollo de los mismos. Para explorar este fenotipo con más detalle, primero se realizó un seguimiento del desarrollo de los nódulos. Se contaron el número de eventos de nodulación por planta en cada línea y fueron fotografiados durante su desarrollo en el tiempo. No se observan diferencias significativas en la línea *mtp2-1*, sin embargo, en el caso de *mtp2-2* vemos como de forma temprana el nódulo deja de desarrollarse, mientras que la planta sigue iniciando eventos de nodulación, resultando en un mayor número de nódulos por planta (Figura 18).

Figura 18. Ensayo de desarrollo de nódulos en los mutantes *mtp2*. **(A)** Capturas del desarrollo de nódulos en el tiempo de las líneas silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Barras: 50 μ m. **(B)** Cinética de nodulación en las líneas silvestre y mutantes. Los datos son la media de 10 plantas $\pm$ SE.

Resultados

Continuando con esta caracterización, nódulos de 28 dpi de cada línea fueron seccionados, teñidos con azul de toluidina y observados en el microscopio. No se distinguen diferencias notables en el caso de *mtp2-1*, pero sí se observa como los nódulos de *mtp2-2* presentan una reducida zona de infección que de forma temprana parece abortar, no desarrollando así zona de fijación si comparamos con nódulos silvestres (Figura 19A). Cuando se toman imágenes aumentadas de la región infectada de *mtp2-2*, que no sobrepasa las 3 o 4 capas de células, vemos como lo que podría corresponder con la zona de infección y diferenciación temprana, parece tener bacteroides en diferenciación, pero las capas posteriores ya aparecen vacuolizadas y desorganizadas (Figura 19B).

Figura 19. Desarrollo de nódulo y bacteroides en los mutantes en el gen *MtMTP2*. **(A)** Secciones longitudinales de nódulos de plantas silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2* de *M. truncatula* a 28 dpi. Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina y visualizadas en microscopio. Barras: 100 µm. **(B)** Detalle de la región infectada de los cortes mostrados en el panel (A). Barras: 10 µm.

La ausencia de zona de fijación en *mtp2-2* sugiere que los rizobios no son capaces de diferenciarse completamente a bacteroides. Para evaluar esta idea se procedió al aislamiento de bacteroides de *S. meliloti* de las tres líneas a 28 dpi. Fueron teñidos con yoduro de propidio, observados en el microscopio de confocal (Figura 20A) y se midió el tamaño de los mismos. Los bacteroides de *mtp2-2* son en torno a un 60% más pequeños respecto a los aislados de nódulos silvestres, sin embargo, doblan en tamaño a bacteroides en vida libre (Figura 20B), Además, son capaces de formar más colonias cuándo son

cultivados en medio sólido (Figura 20C). Estos resultados sugieren que en la línea *mtp2-2* la diferenciación de la bacteria es interrumpida en un estadio intermedio que trunca el desarrollo de bacteroides maduros y/o que se produce una senescencia temprana del nódulo que podría obstaculizar el desarrollo natural del nódulo. Para evaluar esto último, se determinó por qRT-PCR los niveles de expresión de dos genes marcadores de senescencia de nódulo (Xi et al., 2013), Hardy et al., 1968) Hardy et al., 1968) el de una quitinasa (*Medtr5g022560*) y una cisteín proteasa (*Medtr6g079630*). La expresión fue evaluada en nódulos de 28 dpi de plantas silvestres y mutantes, resultando en una inducción para estos genes en el caso de *mtp2-2* (Figura 20D).

Figura 20. Desarrollo de nódulo y bacteroides en los mutantes del gen *MtMTP2*. **(A)** Imagen de confocal de bacteroides de *S. meliloti* 20.11 aislados de nódulos de las tres líneas a 28 dpi teñidos con yoduro de propidio. Barras: 10 μm. **(B)** Longitud de los bacteroides aislados de *S. meliloti* 2011 de nódulos 28 dpi de plantas silvestres, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Los datos son la media de tres experimentos independientes ± SD. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(C)** Unidades Formadoras de Colonia (CFU de sus siglas en inglés) por mg de peso fresco de nódulos a 28 dpi de las tres líneas estudiadas. Los datos son la media de tres experimentos independientes ± SE. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(D)** Expresión relativa de los genes marcadores de senescencia *Chit2* (chitinase *Medtr5g022560*) y *CysProt* (cysteine protease *Medtr6g079630*) en nódulos de *M. truncatula* silvestre, *mtp2-1* y *mtp2-2*. Relativizados al estándar interno *Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa*. Los valores son la media ± SD de dos experimentos independientes con una mezcla de al menos 4 plantas cada uno. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$)

MtATX1

2. MtATX1

Al igual que para el zinc, se buscaron candidatos para la introducción de cobre en el simbiosoma entre los miembros de las familias de transportadores de eflujo de este metal desde el citosol, las P_{1b} -ATPasas (Argüello et al., 2007). Sin embargo, no se encontró ninguno que fuera diferenciadamente regulado por nodulación en las bases de datos disponibles. Esto contrasta con el transportador de cobre específico de nódulo, MtCOPT1, responsable de incorporar el cobre a las células infectadas (Senovilla et al., 2018). El hecho de tener un transportador específico para la entrada en el citosol y ninguno para su salida, nos llevó a plantearnos si la especificidad de esta entrada al simbiosoma no se encontraba a nivel del transportador sino del sistema que media su tránsito entre ambos transportadores. Así, nos planteamos determinar si existía una Cu^+ -chaperona específica de la SNF.

2.1. Análisis de las secuencias de las putativas metalo-chaperonas

Hasta la fecha se han descrito en planta tres Cu^+ -chaperonas citosólicas: AtATX1 que participa en la ruta secretora y parece estar especializada en ceder metal a P_{1b} -ATPasas (Andrés-Colás et al., 2006, Puig et al., 2007), AtCCH que se sugiere estar relacionado con el transporte de cobre a través de plasmodesmos y en su movilización en senescencia. (Himelblau et al., 1998, Mira et al., 2001, Puig et al., 2007) y AtCCS1 Cu^+ -chaperona que activa la SOD1 (Abdel-Ghany et al., 2005). Sin embargo, si la función de una Cu^+ -chaperona es la entrega de cobre de forma específica a aceptores concretos, cabe esperar que la diversidad fuera mucho mayor, aumentando el número posible de combinaciones de interacción entre estos tipos de proteínas. De hecho, cuándo se analizan los genomas de plantas, frecuentemente encontramos proteínas anotadas como “*metal binding protein*” o “*HMA domain*” que en principio tendrían la estructura típica de una Cu^+ -ATPasa: plegamiento protéico $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ y un motivo de unión a metal CXXC (Rosenzweig et al., 1999). Esto incluye a miembros de otras familias como las proteínas HPP/HIPPs (Tehseen et al., 2010). De este modo, usando las Cu^+ -chaperonas conocidas y las HPP/HIPPs se realizaron búsquedas en genomas de estas *A. thaliana* y *M. truncatula* y manualmente se eliminaron las P_{1b} -ATPasas, que también tienen este dominio (Gitschier et al., 1998; Banci et al., 2001; Arnesano et al., 2002). Fueron identificados 52 genes en *M. truncatula* y 44 en *A. thaliana* (ver tabla 9 M&M).

Se aprecian de este modo 5 grupos que, a grandes rasgos están determinados por la identidad de los aminoácidos flanqueantes CXXC de unión a metales, que confieren especificidad de sustrato (Argüello et al., 2007; Eren et al., 2007). En base a esto, se identifican 6 Cu^+ -chaperonas en *M. truncatula* putativas. Así, se organizaron en un dendrograma los genes identificados, resaltando los grupos según el residuo flanqueante fuese un aminoácido con carga positiva (histidina, HCXXC), negativa (ácido aspártico, DCXXC; y ácido glutámico, ECXXC), neutra (XCXXC) resaltando el caso de las cisteínas (CCXXC) (Figura 21).

Figura 21. Dendrograma de las putativas metalo-chaperonas de *M. truncatula* y *A. thaliana*.

2.2. *MtATX1* se expresa específicamente en nódulos

Para determinar el perfil de expresión de los genes seleccionados del genoma de *M. truncatula*, se consultaron las diferentes bases de datos accesibles. Como en el caso del *MtMTP2*, se acudió a las bases de datos de MtGEA (Benedito et al., 2008) y Symbimics (Roux et al., 2014). *Medtr3g111350* fue identificado como el único específico de nódulo, y renombrado como *MtATX1*. Con la intención de corroborar estos datos, se realizaron análisis de qPCR en distintos órganos de la planta crecidos en condiciones simbióticas y no simbióticas, confirmando el perfil específico de expresión en nódulo (Figura 22).

Figura 22. Determinación de la expresión relativa de *MtATX1* mediante qRT-PCR. Expresión del transcrito de *MtATX1* en la parte aérea y raíz de plantas fertilizadas con nitrato amónico, y parte aérea, raíz y nódulo de plantas en condiciones simbióticas a 28 dpi. Relativizado al gen estándar de la *Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa*. Los datos son las medias de al menos tres experimentos independientes $\pm$ SD.

2.3. Estructura terciaria de *MtATX1*

MtATX1 está formada por 195 aminoácidos y parece constar de dos dominios, uno N-terminal y otro C-terminal. El primero, es un dominio típico Cu^+ -chaperona con plegamiento en $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ y el motivo CXXC característicos. Cuando se modela su estructura en base a Cu^+ -chaperonas conocidas el ajuste es muy bueno ($R = 0,969$). El dominio C-terminal se inicia desde el aminoácido 78 y no presenta estructura conocida en las bases de datos. En esta zona, la proteína presenta 8 residuos consecutivos de aspartato, característico de proteínas intrínsecamente desordenadas (Reichmann y Jakob, 2013, Oldfield y Dunker, 2014). En colaboración con el Dr. Fernandez Pacios (UPM) se valoró *in silico* esta característica desordenada del dominio y se modeló usando I-TASSER (Yang et al., 2015) (Figura 23).

Figura 23. Modelo de la estructura de *MtATX1*. En color rojizo el dominio conservado de Cu^+ -chaperona. En verde el dominio desorganizado. Cisteínas del motivo HMA marcadas en letra, CYS22 y CYS25. Repetición de aspartatos resaltados al mostrar las cadenas laterales.

2.4. MtATX1 es una Cu^+ -chaperona

Para validar experimentalmente que *MtATX1* es una Cu^+ -chaperona, se usaron dos aproximaciones: i) complementación del fenotipo mutante de *Δatx1* de *S. cerevisiae* ii) determinación de la afinidad de unir cobre del dominio N-terminal.

La cepa *Δatx1* de levaduras exhibe un fenotipo deficiente en el crecimiento cuando se cultiva en medio no fermentativo a 37 °C tras dos días de crecimiento (Li y Kaplan 2001). Esto es debido a que *ATX1* media el transporte citosólico de cobre (Pufahl et al., 1997). Cuando se elimina, el metal no llega a su destino, provocando desórdenes en la homeostasis de cobre. Uno de los procesos afectados que es más fácil de fenotipar es la respiración celular. *S. cerevisiae* usa como aceptor final de electrones en la mitocondria el O_2 , proceso catalizado por la ferro-cupro-enzima citocromo c oxidasa (COX) (Brunori et al., 2005). Si el cobre no llega la levadura no puede respirar y obtiene toda su energía de la fermentación. De este modo, si se aplica una fuente de carbono no fermentable, la levadura *Δatx1* no puede crecer. (Li y Kaplan, 2001, Gamberi et al., 2009, Soma et al., 2018)

Se utilizaron dos versiones de *MtATX1*. Una versión completa y otra con sólo el dominio Cu^+ -chaperona en N-terminal (aminoácidos 1-78). Ambas se clonaron en el vector de expresión pDR196 y la cepa *Δatx1* fue transformada con ellos. Tanto la cepa parental BY4741, como la mutante *Δatx1* fueron transformadas con el mismo plásmido vacío (pDR196). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 a partir de un cultivo líquido en medio mínimo SD con glucosa y los aminoácidos requeridos por las cepas, ajustado a una densidad óptica de 1. Se cultivaron en el medio YPEG que lleva como fuentes de carbono etanol y glicerol, sustratos no fermentables. Tras dos días de crecimiento a 37 °C se observa como las

dos cepas transformadas, tanto con la versión completa como la truncada de *MtATX1*, mantienen un crecimiento como el de la cepa silvestre BY4741, mientras que la cepa mutante $\Delta atx1$ muestra deficiencia en el mismo. Por otro lado, cuando las 4 líneas son cultivadas en medio rico YPD a 28°C, cuya fuente de carbono es la dextrosa, no muestran diferencias en el crecimiento (Figura 24).

Figura 24. Ensayo de complementación funcional de levaduras con *MtATX1*. La cepa BY4741 fue transformada con el plásmido vacío pDR196, mientras que la cepa mutante $\Delta atx1$ fue transformada por un lado con pDR196 vacío y por otro con las versiones completa y truncada de *MtATX1*. Diluciones seriadas 1:10 de cada transformante fueron crecidas durante 2 días a 37 °C en medio no fermentativo YPEG. El control positivo se realiza en medio rico YPD a 28 °C durante dos días.

Para determinar la capacidad de MtATX1 de unir cobre, tanto la versión completa como la truncada de *MtATX1* se clonaron en diferentes plásmidos de expresión, para ser producidas en *E. coli* BL21 (DE3) pLyss. A pesar de utilizar diferentes estrategias, por el momento no ha sido posible inducir suficiente proteína de la versión completa. Por otro lado, en el caso de la versión truncada (*MtATX1*₁₋₇₈), clonada en el plásmido pET16b que fusiona dos epítopos de estreptavidina en el extremo 5' del inserto, ha sido posible inducir el cultivo y purificar la proteína (Figura 25A). La proteína purificada, MtATX1₁₋₇₈ con su doble epítipo de estreptavidina en el extremo N-terminal, tiene un peso molecular de 12.88 KDa. Para validar que MtATX1₁₋₇₈ es capaz de unir cobre, se incubó la proteína con 10 veces de exceso molar de cobre en presencia de 200 mM de ascorbato para mantenerlo como Cu⁺ y evitar la formación de puentes disulfuro entre la forma CXXC. Tras 5 minutos de incubación, el cobre no unido se separó mediante dilución (10.000x) y concentrado en un centrifugado de 3KDa. El contenido de cobre se mide colorimétricamente (Brenner y Harris, 1995) y la proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), obteniendo un ratio cobre::proteína de 1.0 ± 0.1 (Figura 25B). Como controles se usaron la proteína sin la incubación de cobre (control de que la proteína sin incubar con cobre no presenta este metal) y otro vial sin cobre y con proteína (control de que todo el cobre se elimina en las diluciones)

Las Cu⁺-chaperonas han de funcionar a concentraciones fM-pM de cobre en el citosol (Rae et al., 1999; Palumaa et al., 2006), por lo que si MtATX1 realiza esta función en condiciones fisiológicas, ha de unir cobre con una afinidad en este rango. Para determinarlo, se tituló el nivel de cobre libre en un ensayo de competición entre MtATX1₁₋₇₈ y BCA, molécula capaz de unir cobre en un ratio 1Cu:2BCA

Resultados

con una afinidad conocida y que su absorbancia a 360 nm cambia con la unión al metal (Brenner y Harris, 1995). De este modo, se pudo calcular la constante de equilibrio $\text{MtATX1}_{1-78} + \text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{MtATX1}_{1-78} \cdot \text{Cu}^+$ con un valor de $2.45 \cdot 10^{-12} \pm 3.44 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1}$ y se pudo observar que MtATX1_{1-78} se satura cuando el cobre se une a un ratio de 1:1, obteniendo un valor de 1.03 ± 0.04 , validando el dato anteriormente obtenido (Figura 25C)

Figura 25. Determinación de la afinidad de unión a Cu^+ de MtATX1_{1-78} (A) Immunodetección de MtATX1_{1-78} por Western blot. Coomassie (izquierda) y membrana revelada (derecha). M: marcador; CNI: cultivo no inducido; CI: cultivo inducido; P: proteína purificada. (B) Determinación de la unión de Cu^+ a MtATX1_{1-78} . Los datos son la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. (C) Determinación de la curva de afinidad de cobre por ensayo de competición de MtATX1_{1-78} y BCA. $K_a = 2.45 \cdot 10^{-12} \pm 3.44 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1}$; $n_1 = 1.03 \pm 0.04$; $R = 0.9701$. Los datos son la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes.

2.5. La expresión de *MtATX1* localiza desde la zona II a la zona III de nódulo

Con el propósito de determinar la distribución de la expresión de *MtATX1* en los nódulos, se clonó un segmento de 2198 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de *MtATX1*. El fragmento fue fusionado al gen *gus*. Plantas silvestres de *M. truncatula* R108 se transformaron, se inocularon

con *S. meliloti* y tras 28 dpi se cosechó el material y se visualizaron las zonas en las que se expresa MtATX1 aprovechando que el soluto X-Glc da un producto de color azul cuando es metabolizado por GUS. Esta actividad está localizada principalmente en el extremo apical del nódulo (Figura 26A). Cortes transversales de las mismas muestras detectaron que MtATX1 se expresa principalmente en la zona de infección y diferenciación e interzona y reduce su intensidad en la zona de fijación (Figura 26B). Estos datos son similares a los ofrecidos por la base de datos Symbimics (Roux et al., 2014) (Figura 26C).

Figura 26. Distribución de la expresión de *MtATX1*. **(A)** Ensayo de expresión mediante el gen reportero *gus*. Nódulo de 28 dpi transformados con la construcción *pMtATX1::GUS* en el vector pGWB13. Barra: 100 μ m. **(B)** Ensayo de expresión mediante el gen reportero *gus*. Corte longitudinal de un nódulo de 28dpi transformado con la construcción *pMtATX1::GUS* en el vector pGWB13. Barra: 100 μ m. ZI: zona I; ZII: zona II; IZ: Interzona; ZIII: zona III. **(C)** Expresión de *MtATX1* en diferentes regiones del nódulo. Datos obtenidos de la base de datos Symbimics. ZI: zona I; ZIIp: zona II proximal. ZIIId: zona II distal; IZ: Interzona; ZIII: zona III.

2.6. MtATX1 localiza en células infectadas y no infectadas de nódulo

Para determinar la localización de MtATX1 en nódulo, la misma región promotora del ensayo anterior junto con la región genómica de *MtATX1* fueron fusionadas a tres epítomos de HA en el extremo C-terminal. Plantas silvestres de *M. truncatula* R108 fueron transformadas con esta construcción y se inocularon con la cepa de *S. meliloti* pHc60 que expresa constitutivamente GFP. Los nódulos de las plantas transformadas a 28 dpi fueron recogidos, fijados, cortados e inmunoteñidos con un anticuerpo primario anti-HA y un secundario conjugado ALEXA 594 que emite fluorescencia roja. Las secciones fueron incubadas con DAPI, que se une al ADN y emite fluorescencia azul. Inmediatamente después fueron observadas en el microscopio confocal.

El patrón de expresión de la proteína corresponde con los resultados de la distribución de la actividad GUS determinada por la región promotora de *MtATX1* (Figura 27A), evidenciando la expresión en las zonas de infección y diferenciación, interzona y zona de fijación. A mayores aumentos de una región de la zona de infección y diferenciación tardía (podemos observar canales de infección en verde intenso y células infectadas maduras) se revela la presencia de MtATX1-HA en el interior de las células de nódulo, tanto en células infectadas como no infectadas (Figura 27B).

Figura 27: Localización subcelular de MtATX1 en *M. truncatula*. **(A)** Sección longitudinal de un nódulo de *M. truncatula* de 28 dpi transformado con el inserto *pMtATX1::MtATX1-HA* a partir del vector pGWB13. Las plantas fueron inculadas con *S. meliloti* 2011 pHc60 expresando constitutivamente GFP (verde). La localización de MtATX1 es determinada por la unión del anticuerpo secundario conjugado con ALEXA 594 que emite fluorescencia roja. El ADN fue teñido con DAPI (azul). Barras: 100 μ m. **(B)** Vista aumentada de una región de zona infectada de nódulo de *M. truncatula* a de 28 dpi de plantas transformadas con el inserto *pMtATX1::MtATX1-HA* en el vector pGWB13. Las plantas fueron inculadas con *S. meliloti* 2011 pHc60 expresando constitutivamente GFP (verde). Las muestras fueron tratadas con ALEXA 594 que conjuga con el anticuerpo anti-HA unido a MtATX1-HA (rojo). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Barras: 10 μ m

Como control negativo de fluorescencia, se utilizaron secciones del mismo material vegetal que no habían sido incubadas con el anticuerpo primario anti-HA durante la inmunotinción. No se detectó señal en estos cortes bajo la misma configuración de láseres (Figura 28).

Figura 28. Control de autofluorescencia para la emisión de Alexa 594. Corte transversal de un nódulo de *M. truncatula* transformado con *pMtATX1::MtATX1-HA* a 28 dpi. Durante la inmunotinción se obvió el anticuerpo primario. El nódulo fue inoculado con *S. meliloti* 2011 pH60 que expresa constitutivamente GFP (verde). El ADN fue teñido con DAPI (azul). Paneles: superior a la izquierda, canal DAPI; superior a la derecha, canal GFP; inferior a la izquierda, canal Alexa 594; inferior a la derecha, canal transiluminación. Barras: 100 μ m

2.7. Mutantes insercionales de *MtATX1* no afectan al crecimiento de la planta en condiciones no simbióticas

Con el objetivo de determinar la función biológica de *MtATX1*, se identificaron dos líneas de mutantes insercionales homocigotas *atx1-1* (NF12489) y *atx1-2* (NF13867). En estas líneas el transposón *tnt1* (Tadege et al., 2008) se encuentra insertado en las posiciones +186 y +1044 interrumpiendo los exones dos y tres respectivamente (Figura 29A). Las inserciones suponen la pérdida de su expresión en los dos casos (Figura 29B). Cuando crecemos estas líneas junto con *M. truncatula* R108 silvestres en condiciones no simbióticas, fertilizadas con nitrato amónico, no se observan diferencias significativas de *visu* (Figura 29C) ni en la producción de biomasa (Figura 29D). Por tanto, la ausencia de *MtATX1* en *M. truncatula* no provoca cambios fenotípicos en las condiciones evaluadas.

Figura 29. Fenotipo de las líneas mutantes del gen *MtATX1* en condiciones no simbióticas. **(A)** Posición de la inserción del transposón de *N. tabacum* en la región genómica de los mutantes *atx1-1* y *atx1-2*. Barra: 1 cm **(B)** RT-PCR de *MtATX1* en *M. truncatula* R108 silvestre y los mutantes *atx1-1* y *atx1-2* usando como molde cDNA de nódulo a 28 dpi. El control positivo es la RT-PCR del gen de referencia de *M. truncatula* Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa. **(C)** Plantas representativas silvestres, *atx1-1* y *atx1-2* crecidas en condiciones no simbióticas fertilizadas con nitrato amónico. Barra: 1 cm. **(D)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea.

2.8. Mutantes de *MtATX1* presentan una reducción en la producción de biomasa y en la actividad nitrogenasa cuando son crecidos en condiciones simbióticas

Para evaluar los efectos fisiológicos de la ausencia de *MtATX1* en condiciones simbióticas, las diferentes líneas fueron crecidas tras ser inoculadas con *S. meliloti* 2011. Puesto que las líneas insercionales de las que disponemos presentan varias inserciones del transposón *tnt1* en el genoma (Tadege et al., 2008), para este ensayo fueron incluidas las dos estirpes segregantes de ambas líneas mutantes que portan los alelos silvestres de *MtATX1* en homocigosis. Así, además de la propia línea silvestre de *M. truncatula* R108, se añade un control positivo adicional para cada línea.

Tras 28 dpi, los mutantes *atx1-1* y *atx1-2* presentaba un crecimiento mucho menor que los que contenían la copia silvestre de *MtATX1* (Figura 30A), aunque no se observan diferencias en el desarrollo de los nódulos (Figura 30B). El menor crecimiento de las plantas observados *de visu* se refleja en los pesos secos de las partes aéreas (Figura 30C). No se perciben anomalías en el desarrollo y crecimiento de nódulos. Para relacionar esta deficiencia en el crecimiento con defectos en la fisiología del nódulo, la actividad nitrogenasa fue determinada mediante la técnica de reducción de acetileno y medida en el cromatógrafo de gases. Tanto *atx1-1* como *atx1-2* mutantes presentan una reducción del 53% y 49% de

la actividad nitrogenasa respectivamente respecto a las líneas silvestres (Figura 30D).

Figura 30. Fenotipo de las líneas mutantes del gen *MtATX1* con sus segregantes silvestres y mutantes en homocigosis para este locus en condiciones simbióticas. **(A)** Plantas representativas de las líneas silvestre y mutantes con sus segregantes silvestre e insercionales de *MtATX1* crecidas en condiciones simbióticas a 28 dpi. Barra: 1 cm. **(B)** Nódulos representativos de las líneas. Barra: 500 μ m. **(C)** Peso seco de parte aérea (negro) y raíz (blanco) de las líneas. Los datos son la representación de la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$). **(D)** Actividad nitrogenasa de nódulos a 28 dpi. La reducción de acetileno fue medida en duplicado en 3 sets de una mezcla de 4 plantas cada uno. Los datos son la media $\pm$ SD de tres experimentos con al menos 10 plantas por línea. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey's HSD $p < 0.05$).

Discusión

1. MtMTP2

La familia de transportadores CDF es conocida como MTP en plantas (Ricachenevsky *et al.*, 2013; Kolaj-Robin *et al.*, 2015). Estas proteínas están típicamente involucradas en el transporte de Zn^{2+} , Mn^{2+} , o Fe^{2+} hacia fuera del citosol, ya sea hacia el apoplasto o al interior de algún orgánulo (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Eroglu *et al.*, 2017). Desde un punto de vista fisiológico, sus funciones pueden ser diversas, incluyendo la detoxificación de metales (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005), su acumulación y distribución a órganos sumidero (Eroglu *et al.*, 2017) o la metalación de proteínas (Ellis *et al.*, 2004). En cuanto a su estructura, funcionan como dímeros en los que cada monómero es capaz de operar independientemente (Lu y Fu, 2007; Lu *et al.*, 2009). En cada monómero, los centros de coordinación de metal en el espacio transmembrana toman una conformación geométrica específica que da selectividad al transportador. En el caso del Zn^{2+} , son dos residuos de aspartato en el dominio transmembrana 5 y uno de aspartato y otro de histidina en el dominio transmembrana 2 (Wei y Fu, 2005).

El genoma de *M. truncatula* codifica 13 proteínas MTP, de las cuales sólo una, MtMTP1, había sido previamente caracterizada. MtMTP1 es una proteína que transporta Zn^{2+} desde el citosol (Chen *et al.*, 2009). Se expresa en raíces y partes aéreas, modulado por la disponibilidad al metal. Así, en condiciones de exceso de zinc, aumenta su expresión en partes aéreas y disminuye en raíces. No hay datos relativos a su expresión en nódulo en ese trabajo, pero las bases de datos MtGEA (Benedito *et al.*, 2008) y Symbimics (Roux *et al.*, 2014) indican niveles bajos de expresión en este órgano. Esta Tesis Doctoral ha determinado que MtMTP2 es un transportador de zinc de la familia MTP/CDF que está relacionado con el desarrollo del nódulo. La clasificación de MtMTP2 dentro de la familia MTP/CDFs queda evidenciada por su alto grado de homología con otros miembros de la familia previamente descritos, siendo más similar a aquellos que transportan zinc. Además, su secuencia es fácilmente modelable usando CDFs cristalizados, como es el de YiiP de *E. coli* (Lu y Fu, 2007). El modelo sugiere que el sustrato metálico estaría coordinado tetraédricamente por dos residuos de histidina y dos de glutamato en el espacio transmembrana, ya que estos ocupan geométricamente una localización similar a los residuos que coordinan el zinc en YiiP (Lu y Fu, 2007; Lu *et al.*, 2009). Tres de estos cuatro residuos responsables de coordinar el metal están conservados, y el cuarto se corresponde con el cambio de un glutamato por una histidina. Esta sustitución es consistente con la unión a zinc (Kawachi *et al.*, 2012), y además está conservada en otros transportadores de plantas de la familia MTP que transportan zinc. La complementación funcional de la cepa doble mutante *zrc1/cot* de *S. cerevisiae*, deficitaria en el transporte de zinc desde el citosol a la vacuola (MacDiarmid *et al.*, 2000), respalda la idea de que el sustrato de MtMTP2 es el Zn^{2+} . Esta conclusión también se basa en cambios en la concentración de zinc en los nódulos de la línea mutante de *M. truncatula* *mtp2-2*. A pesar de que otras proteínas MTP pueden tener más de un sustrato de transporte (Ricachenevsky *et al.*, 2013), MtMTP2 no es capaz de complementar funcionalmente cepas de levadura defectivas en el transporte de hierro o manganeso.

Los ensayos de visualización de la transcripción del promotor de MtMTP2 fusionado al gen *gus* muestran que MtMTP2 presenta una expresión diferencial en los distintos órganos de la planta. En la raíz, localiza en la epidermis y en células pertenecientes a la endodermis y el haz vascular. En nódulos, se expresa en células que van desde la zona de infección y diferenciación hasta la de fijación. Los

ensayos de localización de la proteína, ya sean por microscopía confocal o electrónica de transmisión, confirman esta distribución. Además, estas dos últimas aproximaciones indican que MtMTP2 está asociado con algún compartimento de endomembrana. Dada la importancia del zinc en la FSN (Ibrikci y T. Moraghan, 1993; O'Hara, 2001) y de la dirección del transporte de metales de la familia MTP en general y de MtMTP2 en particular (Wei y Fu, 2006), especulamos con la idea de que MtMTP2 debía estar entregando zinc al bacteroide a través de la membrana del simbiosoma. Sin embargo, los análisis de localización por microscopía electrónica de transmisión de nódulos que expresan una copia de MtMTP2-HA indican que éste no es el caso, ya que no se observa proteína asociada a la membrana del simbiosoma. En su lugar, la señal se detecta en cuerpos electro-densos distribuidos a lo largo del citosol de células de nódulo. Esto nos permite descartar estructuras como los plastos o la mitocondria (debido a su morfología concreta), el núcleo (por su estructura y su unicidad), el aparato de Golgi (pues es escaso en la célula) o compartimientos endosomales tardíos (ya que se distribuyen próximos a la membrana plasmática). Teniendo esto en cuenta, hipotetizamos que estas regiones electro-densas son retículo endoplasmático y que MtMTP2 localice en este compartimento. Esta morfología ya ha sido descrita como retículo endoplasmático en otros trabajos (Gavrin *et al.*, 2017). Además, si considerásemos el transporte a la vacuola, esto significaría un papel en el almacenamiento de zinc y no otras funciones activas en la célula. El severo fenotipo observado en el mutante *mtp2-2* y el mantenimiento del mismo cuando es crecido en ausencia de zinc en la solución de riego, hacen descartar la localización vacuolar y ampara la idea de la localización en el retículo endoplasmático. Anteriormente, otras proteínas MTP/CDF se han asociado con el retículo, dónde podrían participar en las modificaciones postraduccionales de la ruta secretora mediante la metalación de proteínas (Ellis *et al.*, 2005). Así, la mutación de *Msc2* en levaduras, provoca la inducción de la respuesta de proteínas no plegadas como consecuencia de que el cofactor zinc no está insertado en las proteínas (Ellis *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2005). Otras proteínas CDF también han sido relacionadas con la metalación, como es el caso de *Zhf1* de *Schizosaccharomyces pombe* (Choi *et al.*, 2018) o de *ZnT5* y *ZnT6* de mamíferos (Suzuki *et al.*, 2005). A pesar de todo, para determinar la localización en el retículo endoplasmático sería necesaria la co-localización con marcadores específicos del orgánulo.

A pesar de que se expresa en muchos órganos de la planta, *MtMTP2* sería especialmente importante en la nodulación. No se observan fenotipos aberrantes en condiciones no simbióticas, indicando que MtMTP2 o bien no es imprescindible para los procesos fisiológicos clave del desarrollo vegetativo de la planta cuando ésta es regada con nitrato amónico, o que la función de *MtMTP2* en estas condiciones es realizada por otra proteína de forma redundante. Sin embargo, cuando el nitrógeno viene de la endosimbiosis con los rizobios, la mutación de *MtMTP2* tiene efectos severos. En otros trabajos, se ha comprobado que la alteración de la homeostasis del zinc produce fenotipos similares, como es el caso del transportador de zinc *MtZIP6*. Plantas transformantes con ARN interferente para este gen tienen una mayor concentración del metal en los nódulos, reducción del tamaño de estos órganos y descenso en su actividad nitrogenasa (Abreu *et al.*, 2017). No obstante, el efecto de la mutación de *MtMTP2* es más severo, ya que se producen alteraciones en el desarrollo del nódulo, en la maduración de los bacteroides, una senescencia temprana y la actividad nitrogenasa es apenas detectable. Probablemente, la razón de estas diferencias en el fenotipo de los dos casos anteriormente expuestos venga dada porque los

transformantes de ARN interferente de *MtZIP6* no tienen completamente eliminada la transcripción del gen como es el caso de *mtp2-2*. Por otro lado, en el caso del mutante *mtp2-1*, la inserción no interrumpe el gen, sino que se encuentra en el promotor de *MtMTP2*, permitiendo una transcripción parcial del 20% respecto plantas silvestres. En este caso el fenotipo no es tan agudo como en *mtp2-2*, se conserva un 40% de la actividad nitrogenasa comparando con la línea silvestre y no se observan alteraciones notables en el desarrollo de nódulo y maduración de bacteroides, una situación similar a los transformantes de ARN de interferencia de *MtZIP6* (Abreu *et al.*, 2017). Este resultado sugiere la existencia de una o varias zinc-proteínas que reciben este metal en el retículo endoplasmático y han de tener efecto en el desarrollo del nódulo y/o la diferenciación de bacteroides. Su ausencia parece provocar una senescencia temprana. Por otro lado, se puede argumentar que *MtMTP2* podría estar protegiendo al nódulo frente a toxicidad por zinc, como otros MTPs que han sido descritos (Blaudez *et al.*, 2003; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando no se añade zinc en la solución de riego, no se observa una mejora en el fenotipo mutante, por lo que *MtMTP2* no parece que esté relacionado con la prevención de toxicidad.

Debido a su perfil de expresión, su dirección de transporte y el fenotipo causado por su mutación, *MtMTP2* parecía ser el mejor candidato para el transporte de zinc al espacio peribacteroideo, sin embargo, los ensayos de localización protéica rechazan esta hipótesis. En su lugar, es probable que la translocación de zinc al bacteroide venga mediada por otros miembros de la familia MTP/CDF o por P_{1b} -ATPasas. Según las bases de datos, no hay miembros de estas familias con expresión específica o claramente inducida en nódulo, por lo que, la especificidad del proceso ha de venir mediada por otros mecanismos. Estos pueden ser, por un lado, modificaciones post-traduccionales que modulen la acción o anclaje en membranas de estos transportadores, o por otro, la presencia de zinc-chaperonas que confieran la especificidad a la proteína encargada de introducir el zinc al interior del simbiosoma. Dirigir esfuerzos hacia la caracterización del Zn-proteoma, que permita identificar las Zn-proteínas que parecen gobernar pasos del desarrollo del nódulo y/o de la diferenciación de bacteroides resultaría clave para futuros trabajos centrados en la homeostasis de zinc en el contexto de la FSN.

2. MtATX1

Dada la limitación para identificar candidatos a introducir Cu^+ en el simbiosoma en base a los datos transcriptómicos disponibles, hipotetizamos que la especificidad podría estar mediada por al menos una Cu^+ -chaperona. Así, se podría mediar el tráfico del metal entre la membrana plasmática y la simbiosomal al establecer interacción específica con proteínas de la ruta. Las Cu^+ -chaperonas citosólicas están caracterizadas por presentar un dominio de unión a metal, de estructura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ con un motivo CXXC responsable de la coordinación del metal (Rosenzweig *et al.*, 1999; Huffman y O'Halloran, 2001). Este dominio también está presente en algunas P_{1b} -ATPasas (Gitschier *et al.*, 1998; Banci *et al.*, 2001). Basándonos en estas características, identificamos en el genoma de *M. truncatula* al menos 52 genes que probablemente codifiquen para metalochaperonas, si bien no todas sean específicas de Cu^+ . Trabajos previos han indicado como los aminoácidos flanqueantes al motivo CXXC confieren especificidad a sustratos distintos del Cu^+ . Así, cuando este aminoácido es ácido (aspartato o glutamina) tiene mayor afinidad para unir Zn^{2+} , mientras que cuando el residuo tiene carga neutra es más afin a metales monovalentes como el Cu^+ (Banci *et al.*, 2002; Banci *et al.*, 2006). Atendiendo a este criterio,

las putativas metalochaperonas identificadas se clasificaron según el aminoácido flanqueante desde el extremo N-terminal y se organizaron en un dendrograma. En éste, se aprecia cierta correlación entre la organización de las ramas del árbol y la clasificación por motivo anteriormente explicada. No obstante, asignar la función sería aventurado, dado que la mayoría de estas proteínas no están descritas y sería necesario caracterizarlas en detalle para obtener conclusiones al respecto. Por otro lado, la aparente abundancia de metalochaperonas putativas sugiere nuevas rutas de distribución intracelular de metal mediadas por estas proteínas aún por caracterizar.

De las proteínas identificadas en *M. truncatula*, sólo MtATX1 se expresa específicamente en los nódulos según las bases de datos transcriptómicos y los datos obtenidos en el laboratorio, lo que sugiere un papel importante en la FSN. La proteína es de mayor tamaño que una Cu⁺-chaperona típica, ya que presenta un dominio adicional en C-terminal. En el modelaje de MtATX1 se obtiene un dominio C-terminal a partir del aminoácido 79, que no encuentra homología con proteínas descritas y además presenta una repetición de 8 residuos de aspartato consecutivos, características típicas de proteínas intrínsecamente desordenadas (Oldfield y Dunker, 2014). Estas regiones, flexibles y estructuralmente inestables pueden contribuir a diferentes funciones ya sean la acomodación de modificaciones transduccionales, (Gao y Xu, 2012), regulaciones alostéricas (Johnson, 1992) o interacciones con otros elementos celulares como proteínas (Kuriyan y Eisenberg, 2007; Dunker *et al.*, 2005) o ácidos nucleicos (Nadassy *et al.*, 1999) o incluso unir metales en los grupos carboxilo de la repetición de aspartatos. Ésto apoya la hipótesis de la especificidad funcional a la hora de interaccionar con otras proteínas y/o el propio entorno celular del nódulo. La existencia de un dominio extra en las Cu⁺-chaperona no es exclusivo de MtATX1. En la archaia *A. fulgidus* hay un dominio adicional en N-terminal (Sazinsky *et al.*, 2007). Más próximo, en *A. thaliana*, AtCCH también tiene un dominio C-terminal. Ensayos que comparan interacciones de la proteína completa o una versión truncada que sólo presenta el dominio conservado de Cu⁺-chaperona muestran como interaccionan con diferentes proteínas dependiendo de la presencia o no del dominio extra, indicando que éste determina la funcionalidad de AtCCH (Mira *et al.*, 2001; Andrés-Colás *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007). Dado que el dominio C-terminal de MtATX1 es específico de leguminosas y solo se expresa en nódulos, hipotetizamos que confiera alguna característica específica relacionada con la simbiosis. Respecto al dominio N-terminal de MtATX1, tiene la estructura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ y el motivo CXXC en el extremo de la primera α -hélice, coincidiendo con la topología típica otras Cu⁺-chaperonas (Arnesano *et al.*, 2001; Markossian y Kurganov, 2003). La ausencia de aminoácidos cargados flanqueando al dominio CXXC, indica que su sustrato podría ser Cu⁺. Así, *MtATX1* es capaz de complementar funcionalmente la cepa mutante de Δatx1 de *S. cerevisiae*, ya sea transformando esta cepa con un plásmido de expresión que lleva una copia expresar el gen completo o con una versión *MtATX1*₁₋₇₈ que sólo lleva el dominio conservado Cu⁺-chaperona. Además, se ha podido determinar bioquímicamente en la versión *MtATX1*₁₋₇₈, su capacidad de unir cobre y su afinidad al metal. Estos resultados sugieren que la proteína debe estar funcionando en nódulos de *M. truncatula* como Cu⁺-chaperona y que el dominio conservado en N-terminal ya tiene las características típicas de estas proteínas.

Los ensayos de localización de la expresión mediante promotor::*gus* indican que *MtATX1* se expresa en las regiones que van desde la zona de infección y diferenciación del nódulo hasta la zona de fijación, siendo especialmente intensa en zona II e interzona. Esta distribución de la expresión es muy

similar a la de *MtCOPT1*, transportador de cobre específico de nódulo encargado de introducir cobre en sus células (Senovilla *et al.*, 2018). En los ensayos de inmunodetección se observa que también coincide la distribución proteica que va desde la zona II a la zona III, aunque en el caso de *MtATX1* también localiza en células no infectadas. Mientras que *MtCOPT1* está descrita en la membrana plasmática de estas células (Senovilla *et al.*, 2018), los ensayos de esta Tesis Doctoral detectan a *MtATX1* en el interior de las células de nódulo, probablemente en el citoplasma. A falta de confirmar la localización con marcadores de proteínas citoplasmáticas u otras aproximaciones, la naturaleza soluble de las chaperonas (Arnesano *et al.*, 2002) y la distribución de la señal obtenida en las imágenes de microscopía confocal, sugieren que la proteína es citosólica. Estos datos hacen de *MtCOPT1* y *MtATX1* interactores potenciales, y nos permite hipotetizar la existencia de una nueva ruta de tráfico intracelular de cobre en la FSN. El modelo más simple para esta ruta consistiría en un transportador (que sugerimos *MtCOPT1*) que ceda a la Cu^+ -chaperona (*MtATX1*) el metal y ésta misma lo donase al importador responsable de la carga en el simbiosoma. Respecto a este último elemento, las proteínas de la familia P_{1b} -ATPasas son las principales candidatas (Argüello *et al.*, 2007). Dado que ninguna tiene un perfil de expresión que incite a pensar en un papel específico en la simbiosis, predicciones *in silico* podrían ayudar a sugerir candidatos, pero cualquiera con expresión en nódulos ha de ser tomada en cuenta. Futuros esfuerzos en identificación de proteínas que interaccionen con *MtATX1* ofrecerán información relevante para entender el tráfico intracelular de cobre en las células de nódulo y la/s ruta/s en las que participa esta Cu^+ -chaperona.

Al ser *MtATX1* específica de nódulo, su función probablemente esté relacionada con la FSN. Esto lo apoya el hecho de que no se observen diferencias entre las dos líneas mutantes *atx1-1* y *atx1-2* y la línea silvestre cuando son crecidas en condiciones no simbióticas, suplementadas con nitrato amónico en el riego. Sin embargo, las líneas mutantes se ven afectadas cuando se crecen en condiciones simbióticas inoculadas con *S. meliloti*, ya que manifiestan una menor producción de biomasa y una reducción del 53% y 49% de la actividad nitrogenasa respecto a la silvestre. Un fenotipo similar muestra el mutante *copt1-1* y además muestra que sus niveles de cobre por biomasa de nódulo aumentados (Senovilla *et al.*, 2018), avalando la tesis de una interacción entre *MtCOPT1* y *MtATX1*. Estos datos indican que *MtATX1* es esencial para un correcto desarrollo de la FSN, por lo que cabría esperar que participe directamente en la distribución del cobre hacia el bacteroide, aunque también es cierto que podría afectar a procesos secundarios como la respiración celular o la prevención de estrés oxidativo, que acaben afectando a la propia FSN.

Conclusiones

1. *MtMTP2* es miembro de la familia de proteínas CDF/MTP y tiene capacidad de transportar zinc desde el citosol.
2. *MtMTP2* se expresa en la epidermis y endodermis de la raíz y en células infectadas y no infectadas de nódulo. En las células de nódulos se encuentra introduciendo zinc en el retículo endoplasmático.
3. La ausencia de *MtMTP2* produce un desarrollo alterado en el nódulo, defectos en la diferenciación de bacteroides, altera la homeostasis de zinc en nódulos y causa una reducción severa de la actividad nitrogenasa, siendo necesario para una correcta FSN en *M. truncatula*. Este fenotipo no es restaurado cuándo la planta es cultivada en deficiencia o exceso de zinc.
4. *MtATX1* es una Cu⁺-chaperona que se expresa específicamente en nódulos de *M. truncatula*, localizando en el interior de las células del nódulo, en la zona en la que se localiza el transportador de Cu⁺ específico de nódulos MtCOPT1.
5. *MtATX1* juega un papel importante en la FSN, pues su ausencia reduce a la mitad la actividad nitrogenasa en nódulos de *M. truncatula*.

Bibliografía

- Abdel-Ghany, S. E., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J. R., Puig, S., Peñarrubia, L. Pilon, M. (2005a) 'AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7', *FEBS Lett*, 579(11), pp. 2307-12.
- Abdel-Ghany, S. E., Müller-Moulé, P., Niyogi, K. K., Pilon, M. y Shikanai, T. (2005b) 'Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts', *Plant Cell*, 17(4), pp. 1233-51.
- Abreu, I., Saéz, Á., Castro-Rodríguez, R., Escudero, V., Rodríguez-Haas, B., Senovilla, M., Larue, C., Grolimund, D., Tejada-Jiménez, M., Imperial, J. y González-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* Zinc-Iron Permease6 provides zinc to rhizobia-infected nodule cells', *Plant Cell Environ*, 40(11), pp. 2706-2719.
- Akkermans, M. D., van der Horst-Graat, J. M., Eussen, S. R., van Goudoever, J. B. y Brus, F. (2016) 'Iron and vitamin D deficiency in healthy young children in western europe despite current nutritional recommendations', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62(4), pp. 635-42.
- Alloway, B. J. (2008) Zinc in soils and crop nutrition. *IZA and IFA Pub, Brussels, 2008, 139p*
- Alloway, B. J. (2012) Heavy Metals in Soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. *Springer Netherlands*.
- Alunni, B. y Gourion, B. (2016) 'Terminal bacteroid differentiation in the legume-rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond', *New Phytol*, 211(2), pp. 411-7.
- Alvarez-Fernández, A., Díaz-Benito, P., Abadía, A., López-Millán, A. F. y Abadía, J. (2014) 'Metal species involved in long distance metal transport in plants', *Front Plant Sci*, 5, pp. 105.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. y Rosato, A. (2006) 'Zinc through the three domains of life', *J Proteome Res*, 5(11), pp. 3173-8.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Puig, S. y 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.
- Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C. J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D. H. (2004) 'Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 186(22), pp. 7499-507.
- Appleby, C. A. (1984) 'Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration', *Annu Rev Plant Physiol*, 35(1), pp. 443-478.
- Argüello, J. M., Eren, E. y González-Guerrero, M. (2007) 'The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases', *Biometals*, 20(3-4), pp. 233-48.
- Argüello, J. M., Patel, S. J. y Quintana, J. (2016) 'Bacterial Cu(+)-ATPases: models for molecular structure-function studies', *Metallomics*, 8(9), pp. 906-14.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L. y O'Halloran, T. V. (2002) 'Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures', *Genome Res*, 12(2), pp. 255-71.
- Arrivault, S., Senger, T. y Krämer, U. (2006) 'The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and

- Zn oversupply', *Plant J*, 46(5), pp. 861-79.
- Attallah, C. V., Welchen, E., Pujol, C., Bonnard, G. y Gonzalez, D. H. (2007) 'Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis', *Plant Mol Biol*, 65(3), pp. 343-55.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. 1995. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons ed.: Inc., New York, N.Y.
- Baker, Z. N., Cobine, P. A. y Leary, S. C. (2017) 'The mitochondrion: a central architect of copper homeostasis', *Metallomics*, 9(11), pp. 1501-1512.
- Balandin, T. y Castresana, C. (2002) 'AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17', *Plant Physiol*, 129(4), pp. 1852-7.
- Bapaume, L. y Reinhardt, D. (2012) 'How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza', *Front Plant Sci*, 3, pp. 223.
- Bashir, F. A., Shuhaimi-Othman, M. y Mazlan, A. G. (2012) 'Evaluation of trace metal levels in tissues of two commercial fish species in Kapar and Mersing coastal waters, Peninsular Malaysia', *J Environ Public Health*, 2012, pp. 352309.
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M. y Dalton, D. A. (2010) 'Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules', *New Phytol*, 188(4), pp. 960-76.
- Becana, M. y Rodríguez-Barrueco, C. (1989) 'Protective mechanisms of nitrogenase against oxygen excess and partially-reduced oxygen intermediates', *Physiol Plant*, 75(3), pp. 429-438.
- Behm, J. E., Geurts, R. y Kiers, E. T. (2014) '*Parasponia*: a novel system for studying mutualism stability', *Trends Plant Sci*, 19(12), pp. 757-63.
- Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P. X., Tang, Y. y Udvardi, M. K. (2008) 'A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*', *Plant J*, 55(3), pp. 504-13.
- Bergersen, F. J. y Appleby, C. A. (1981) 'Leghaemoglobin within bacteroid-enclosing membrane envelopes from soybean root nodules', *Planta*, 152(6), pp. 534-43.
- Beringer, J. E. (1974) 'R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*', *J Gen Microbiol*, 84(1), pp. 188-98.
- Bertani, G. (1951) 'Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 62(3), pp. 293.
- Bharathi Devi, S. R., Dhivya M, A. y Sulochana, K. N. (2016) 'Copper transporters and chaperones: Their function on angiogenesis and cellular signalling', *J Biosci*, 41(3), pp. 487-96.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L. y Schwede, T. (2014) 'SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information', *Nucleic Acids Res*, 42(Web Server issue), pp. W252-8.
- Blaby-Haas, C. E., Padilla-Benavides, T., Stübe, R., Argüello, J. M. y Merchant, S. S. (2014) 'Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis', *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*, 111(50), pp. E5480-7.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D. y Chalot, M. (2003) 'Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif', *Plant Cell*, 15(12), pp. 2911-28.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. y 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.
- Boutigny, S., Sautron, E., Finazzi, G., Rivasseau, C., Frelet-Barrand, A., Pilon, M., Rolland, N. y Seigneurin-Berny, D. (2014) 'HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope P_{1B}-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis', *J Exp Bot*, 65(6), pp. 1529-40.
- 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.
- Brear, E. M., Day, D. A. y Smith, P. M. (2013) 'Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis', *Front Plant Sci*, 4, pp. 359.
- Brenner, A. J. y Harris, E. D. (1995) 'A quantitative test for copper using bicinchoninic acid', *Anal Biochem*, 226(1), pp. 80-4.
- Brewin, N. J. (2004) 'Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis', *CRC Crit Rev Plant Sci*, 23(4), pp. 293-316.
- Brito, B., Palacios, J. M., Hidalgo, E., Imperial, J. y Ruiz-Argüeso, T. (1994) 'Nickel availability to pea (*Pisum sativum* L.) plants limits hydrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids by affecting the processing of the hydrogenase structural subunits', *J Bacteriol*, 176(17), pp. 5297-303.
- Brown, S. M. y Walsh, K. B. (1994) 'Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability', *Funct Plant Biol*, 21(1), pp. 49-68.
- Brunori, M., Giuffrè, A. y Sarti, P. (2005) 'Cytochrome c oxidase, ligands and electrons', *J Inorg Biochem*, 99(1), pp. 324-36.
- Burch-Smith, T. M. y Zambryski, P. C. (2012) 'Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within', *Annu Rev Plant Biol*, 63, pp. 239-60.
- Burkhead, J. L., Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M. y Pilon, M. (2009) 'Copper homeostasis', *New Phytol*, 182(4), pp. 799-816.
- Burris, R. H. y Roberts, G. P. (1993) 'Biological nitrogen fixation', *Annu Rev Nutr*, 13, pp. 317-35.
- Capdevila, D. A., Edmonds, K. A. y Giedroc, D. P. (2017) 'Metallochaperones and metalloregulation in bacteria', *Essays Biochem*, 61(2), pp. 177-200.
- Castaings, L. ;Caquot, A. ;Loubet, S. ;Curie, C. (2016) The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Sci Rep* (6) pp. 37222
- Chao, Y. y Fu, D. (2004) 'Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB', *J Biol Chem*, 279(13), pp. 12043-50.

- Chapman, M. J. y Margulis, L. (1998) 'Morphogenesis by symbiogenesis', *Int Microbiol*, 1(4), pp. 319-26.
- Charrier, B., Coronado, C., Kondorosi, A. y Ratet, P. (1995) 'Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes', *Plant Mol Biol*, 29(4), pp. 773-86.
- Chen, M., Shen, X., Li, D., Ma, L., Dong, J. y Wang, T. (2009) 'Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the *Medicago truncatula*', *Plant Physiol Biochem*, 47(11-12), pp. 1089-94.
- Cheng, H. P. y 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.
- Cho, S. J., Lee, M. G., Yang, J. K., Lee, J. Y., Song, H. K. y Suh, S. W. (2000) 'Crystal structure of *Escherichia coli* CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), pp. 8932-7.
- Choi, S., Hu, Y. M., Corkins, M. E., Palmer, A. E. y Bird, A. J. (2018) 'Zinc transporters belonging to the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family have complementary roles in transporting zinc out of the cytosol', *PLoS Genet*, 14(3), pp. e1007262.
- Chu, C. C., Lee, W. C., Guo, W. Y., Pan, S. M., Chen, L. J., Li, H. M. y Jinn, T. L. (2005) 'A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 139(1), pp. 425-36.
- Clarkson, D. T. (1996) 'Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. second edition. 889pp. *Ann Bot*, 78(4), pp. 527-528.
- Clemens, S., Deinlein, U., Ahmadi, H., Höreth, S. y Uraguchi, S. (2013) 'Nicotianamine is a major player in plant Zn homeostasis', *Biomaterials*, 26(4), pp. 623-32.
- Clemens, S., Palmgren, M. G. y Krämer, U. (2002) 'A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation', *Trends Plant Sci*, 7(7), pp. 309-15.
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E. y Blanco, F. A. (2018) 'Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful Nitrogen-Fixing Symbiosis', *Genes (Basel)*, 9(3).
- Coba de la Peña, T., Fedorova, E., Pueyo, J. J. y Lucas, M. M. (2017) 'The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle?', *Front Plant Sci*, 8, pp. 2229.
- Cobine, P. A., Pierrel, F., Bestwick, M. L. y Winge, D. R. (2006) 'Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase', *J Biol Chem*, 281(48), pp. 36552-9.
- Cobine, P. A., Pierrel, F. y Winge, D. R. (2006) 'Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes', *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), pp. 759-72.
- Cohu, C. M., Abdel-Ghany, S. E., Gogolin Reynolds, K. A., Onofrio, A. M., Bodecker, J. R., Kimbrel, J. A., Niyogi, K. K. y Pilon, M. (2009) 'Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant', *Mol Plant*, 2(6), pp. 1336-50.
- Connolly, E. L., Campbell, N. H., Grotz, N., Prichard, C. L. y Guerinot, M. L. (2003) 'Overexpression

- of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control', *Plant Physiol*, 133(3), pp. 1102-10.
- Conte, S. S., Chu, H. H., Rodriguez, D. C., Punshon, T., Vasques, K. A., Salt, D. E. y Walker, E. L. (2013) 'Arabidopsis thaliana Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis', *Front Plant Sci*, 4, pp. 283.
- Cooper, J. E. (2007) 'Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue', *J Appl Microbiol*, 103(5), pp. 1355-65.
- Crespi, M. y Frugier, F. (2008) 'De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis', *Sci Signal*, 1(49), pp. re11.
- Crews, T. E. y Peoples, M. (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agr. Ecos. & Envirom.* pp 279-297
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B. y Gitlin, J. D. (1997) 'The copper chaperone for superoxide dismutase', *J Biol Chem*, 272(38), pp. 23469-72.
- Culotta, V. C., Liu, X.-F. y Schmidt, P. (1999) 'The transport and intracellular trafficking of metal ions in yeast', *Metal genet* pp. 353-363.
- Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R. y Briat, J. F. (2000) 'Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport', *Biochem J*, 347 Pt 3, pp. 749-55.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. y Mari, S. (2009) 'Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters', *Ann Bot*, 103(1), pp. 1-11.
- Curie, C. y Mari, S. (2017) 'New routes for plant iron mining', *New Phytol*, 214(2), pp. 521-525.
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S. y Klausner, R. D. (1994) 'The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake', *J Biol Chem*, 269(41), pp. 25660-7.
- Dazzo, F. (1982) 'Leguminous root nodules'. *Exp Mic Eco*, pp 431-446
- de Abreu-Neto, J. B., Turchetto-Zolet, A. C., de Oliveira, L. F., Zanettini, M. H. y Margis-Pinheiro, M. (2013) 'Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants', *FEBS J*, 280(7), pp. 1604-16.
- De Feo, C. J., Aller, S. G., Siluvai, G. S., Blackburn, N. J. y Unger, V. M. (2009) 'Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), pp. 4237-42.
- Delhaize, E., Gruber, B. D., Pittman, J. K., White, R. G., Leung, H., Miao, Y., Jiang, L., Ryan, P. R. y Richardson, A. E. (2007) 'A role for the AtMTP11 gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance', *Plant J*, 51(2), pp. 198-210.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D. M., White, R. G. y Ryan, P. R. (2003) 'Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance', *Plant Cell*, 15(5), pp. 1131-42.
- Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voigt, K., Schröder, A., Arrivault, S., Thomine, S. y Krämer, U. (2005) 'Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn

- detoxification and drives leaf Zn accumulation', *FEBS Lett*, 579(19), pp. 4165-74.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. y Shoelson, S. E. (2000) 'Crystal structure of human frataxin', *J Biol Chem*, 275(40), pp. 30753-6.
- Douglas, C. D., Ngu, T. T., Kaluarachchi, H. y Zamble, D. B. (2013) 'Metal transfer within the *Escherichia coli* HypB-HypA complex of hydrogenase accessory proteins', *Biochemistry*, 52(35), pp. 6030-9.
- Downie, J. A. (2010) 'The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots', *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), pp. 150-70.
- Dräger, D. B., Desbrosses-Fonrouge, A. G., Krach, C., Chardonnens, A. N., Meyer, R. C., Saumitou-Laprade, P. y Krämer, U. (2004) 'Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels', *Plant J*, 39(3), pp. 425-39.
- Dupont, C. L., Yang, S., Palenik, B. y Bourne, P. E. (2006) 'Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47), pp. 17822-7.
- Eggert, K. y von Wirén, N. (2013) 'Dynamics and partitioning of the ionome in seeds and germinating seedlings of winter oilseed rape', *Metallomics*, 5(9), pp. 1316-25.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. y 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.
- Ellis, C. D., Macdiarmid, C. W. y Eide, D. J. (2005) 'Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells', *J Biol Chem*, 280(31), pp. 28811-8.
- Ellis, C. D., Wang, F., MacDiarmid, C. W., Clark, S., Lyons, T. y Eide, D. J. (2004) 'Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function', *J Cell Biol*, 166(3), pp. 325-35.
- Eren, E., González-Guerrero, M., Kaufman, B. M. y Argüello, J. M. (2007) 'Novel Zn²⁺ coordination by the regulatory N-terminus metal binding domain of *Arabidopsis thaliana* Zn(2+)-ATPase HMA2', *Biochemistry*, 46(26), pp. 7754-64.
- Eroglu, S., Giehl, R. F. H., Meier, B., Takahashi, M., Terada, Y., Ignatyev, K., Andresen, E., Küpper, H., Peiter, E. y von Wirén, N. (2017) 'Metal tolerance protein 8 mediates manganese homeostasis and iron reallocation during seed development and germination', *Plant Physiol*, 174(3), pp. 1633-1647.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E. y Gresshoff, P. M. (2010) 'Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation', *J Integr Plant Biol*, 52(1), pp. 61-76.
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X. y Gresshoff, P. M. (2018) 'Legume nodulation: The host controls the party', *Plant Cell Environ*.
- Field, L. S., Furukawa, Y., O'Halloran, T. V. y Culotta, V. C. (2003) 'Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria', *J Biol Chem*, 278(30), pp. 28052-9.
- Finkelstein, J. (2009) 'Metalloproteins', *Nature*, 460(7257), pp. 813.

- Fiore, C. L., Jarett, J. K., Olson, N. D. y Lesser, M. P. (2010) 'Nitrogen fixation and nitrogen transformations in marine symbioses', *Trends Microbiol*, 18(10), pp. 455-63.
- Foster, A. W., Osman, D. y Robinson, N. J. (2014) 'Metal preferences and metallation', *J Biol Chem*, 289(41), pp. 28095-103.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. y Voss, M. (2013) 'The global nitrogen cycle in the twenty-first century', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1621), pp. 20130164.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. y Perret, X. (1997) 'Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes', *Nature*, 387(6631), pp. 394-401.
- Fujiwara, T., Kawachi, M., Sato, Y., Mori, H., Kutsuna, N., Hasezawa, S. y Maeshima, M. (2015) 'A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*', *FEBS J*, 282(10), pp. 1965-79.
- Gage, D. J. (2004) 'Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes', *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), pp. 280-300.
- Galloway, J. N. (2005) 'The global nitrogen cycle: past, present and future', *Sci China C Life Sci*, 48 Suppl 2, pp. 669-78.
- Gamberi, T., Magherini, F., Borro, M., Gentile, G., Cavalieri, D., Marchi, E. y Modesti, A. (2009) 'Novel insights into phenotype and mitochondrial proteome of yeast mutants lacking proteins Sco1p or Sco2p', *Mitochondrion*, 9(2), pp. 103-14.
- Gavrin, A., Kulikova, O., Bisseling, T. y Fedorova, E. E. (2017) 'Interface symbiotic membrane formation in root nodules of', *Front Plant Sci*, 8, pp. 201.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H. y Walker, G. C. (2008) 'Molecular determinants of a symbiotic chronic infection', *Annu Rev Genet*, 42, pp. 413-41.
- Gietz, R. D. y 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.
- Gil-Díez, P., Tejada-Jiménez, M., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K. S., Imperial, J. y González-Guerrero, M. (2019) 'MtMOT1.2 is responsible for molybdate supply to *Medicago truncatula* nodules', *Plant Cell Environ*. pp. 310-320.
- Glerum, D. M., Shtanko, A. y Tzagoloff, A. (1996) 'Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase', *J Biol Chem*, 271(24), pp. 14504-9.
- González-Guerrero, M. y Argüello, J. M. (2008a) 'Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(16), pp. 5992-7.
- González-Guerrero, M., Eren, E., Rawat, S., Stemmler, T. L. and Argüello, J. M. (2008b) 'Structure of the two transmembrane Cu⁺ transport sites of the Cu⁺-ATPases', *J Biol Chem*, 283(44), pp. 29753-9.
- González-Guerrero, M., Escudero, V., Saéz, Á. y Tejada-Jiménez, M. (2016) 'Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia', *Front*

- Plant Sci*, 7, pp. 1088.
- González-Guerrero, M., Hong, D. y Argüello, J. M. (2009) 'Chaperone-mediated Cu⁺ delivery to Cu⁺ transport ATPases: requirement of nucleotide binding', *J Biol Chem*, 284(31), pp. 20804-11.
- González-Guerrero, M., Matthiadis, A., Sáez, Á. y Long, T. A. (2014) 'Fixating on metals: new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation', *Front Plant Sci*, 5, pp. 45.
- Gross, E. L. (1993) 'Plastocyanin: structure and function', *Photosynth Res*, 37(2), pp. 103-16.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L. y Eide, D. (1998) 'Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), pp. 7220-4.
- Grotz, N. y Guerinot, M. L. (2006) 'Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants', *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), pp. 595-608.
- Guerinot, M. L. (2000) 'The ZIP family of metal transporters', *Biochim Biophys Acta*, 1465(1-2), pp. 190-8.
- Guerinot, M. L., Meidl, E. J. y Plessner, O. (1990) 'Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*', *J Bacteriol*, 172(6), pp. 3298-303.
- Guinel, F. C. (2009a) 'Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types', *Botany*, 87(12), pp. 1117-1138.
- Guinel, F. C. (2009b) 'Getting around the legume nodule: II. Molecular biology of its peripheral zone and approaches to study its vasculature', *Botany*, 87(12), pp. 1139-1166.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. y Hediger, M. A. (1997) 'Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter', *Nature*, 388(6641), pp. 482-8.
- Gupta, S., Chai, J., Cheng, J., D'Mello, R., Chance, M. R. y Fu, D. (2014) 'Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport', *Nature*, 512(7512), pp. 101-4.
- Haag, A. F., Arnold, M. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P. y Ferguson, G. P. (2013) 'Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis', *FEMS Microbiol Rev*, 37(3), pp. 364-83.
- Haas, C. E., Rodionov, D. A., Kropat, J., Malasarn, D., Merchant, S. S. y de Crécy-Lagard, V. (2009) 'A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life', *BMC Genomics*, 10, pp. 470.
- 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. y 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.
- Hanahan, D. (1983) 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *J Mole Biol*, 166(4), pp. 557-580.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. y Burns, R. C. (1968) 'The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation', *Plant Physiol*, 43(8), pp. 1185-207.

- Harris, W. R., Sammons, R. D. y Grabiak, R. C. (2012) 'A speciation model of essential trace metal ions in phloem', *J Inorg Biochem*, 116, pp. 140-50.
- Haydon, M. J. y Cobbett, C. S. (2007) 'A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 143(4), pp. 1705-19.
- Hernandez, J. A., Curatti, L., Aznar, C. P., Perova, Z., Britt, R. D. y Rubio, L. M. (2008) 'Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33), pp. 11679-84.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Peñarrubia, L. y Amasino, R. M. (1998) 'Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 117(4), pp. 1227-34.
- Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P., Dancis, A. y Ecker, J. R. (1999) 'RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*', *Cell*, 97(3), pp. 383-93.
- Hirsch, P. R. y Mauchline, T. H. (2015) 'The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition', *Adv Appl Microbiol*, 93, pp. 45-71.
- Hirschi, K. D. (2009) 'Nutrient biofortification of food crops', *Annu Rev Nutr*, 29, pp. 401-21.
- Horn, D. y Barrientos, A. (2008) 'Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase', *IUBMB Life*, 60(7), pp. 421-9.
- Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S. y Winge, D. R. (2004) 'Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase', *J Biol Chem*, 279(34), pp. 35334-40.
- Huffman, D. L. y O'Halloran, T. V. (2001) 'Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins', *Annu Rev Biochem*, 70, pp. 677-701.
- Hunt, S., King, B. J., Canvin, D. T. y Layzell, D. B. (1987) 'Steady and nonsteady state gas exchange characteristics of soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier', *Plant Physiol*, 84(1), pp. 164-72.
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J. F. y Cobbett, C. S. (2004) 'P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 16(5), pp. 1327-39.
- Iannetta, P. P. M., De Lorenzo, C., James, E. K., Fernandez-Pascual, M., Sprent, J. I., Lucas, M. M., Witty, J. F., De Felipe, M. R. y Minchin, F. R. (1993) 'Oxygen Diffusion in Lupin NodulesI. Visualization of diffusion barrier operation', *J. Exp. Bot.*, 44(9), pp. 1461-1467.
- Ibrikci, H. y T. Moraghan, J. (1993) Differential responses of soybean and dry bean to zinc deficiency.
- Imperial, J., Ugalde, R. A., Shah, V. K. y Brill, W. J. (1984) 'Role of the nifQ gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*', *J Bacteriol*, 158(1), pp. 187-94.
- Ishimaru, Y., Bashir, K. y Nishizawa, N. K. (2011) 'Zn Uptake and Translocation in Rice Plants', *Rice*, 4(1), pp. 21-27.

- Isobe, K. y Ohte, N. (2014) 'Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling', *Microbes Environ*, 29(1), pp. 4-16.
- Jain, A., Wilson, G. T. y Connolly, E. L. (2014) 'The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis', *Front Plant Sci*, 5, pp. 100.
- Kaiser, B. N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., Puppo, A. y Day, D. A. (2003) 'The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport', *Plant J*, 35(3), pp. 295-304.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Kogawa, S., Mimura, T., Krämer, U. y Maeshima, M. (2012) 'Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of *Arabidopsis* MTP1', *FEBS J*, 279(13), pp. 2339-2356.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T. y Maeshima, M. (2008) 'Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn(2+)/H(+) antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity', *J Biol Chem*, 283(13), pp. 8374-83.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mori, H., Tomioka, R., Lee, Y. y Maeshima, M. (2009) 'A mutant strain *Arabidopsis thaliana* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc', *Plant Cell Physiol*, 50(6), pp. 1156-70.
- Kawamata, H. y Manfredi, G. (2010) 'Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space', *Antioxid Redox Signal*, 13(9), pp. 1375-84.
- Kereszt, A., Mergaert, P. y Kondorosi, E. (2011) 'Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims?', *Mol Plant Microbe Interact*, 24(11), pp. 1300-9.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kaplan, J. y Guerinot, M. L. (2006) 'Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1', *Science*, 314(5803), pp. 1295-8.
- Kirby, K., Jensen, L. T., Binnington, J., Hilliker, A. J., Ulloa, J., Culotta, V. C. y Phillips, J. P. (2008) 'Instability of superoxide dismutase 1 of *Drosophila* in mutants deficient for its cognate copper chaperone', *J Biol Chem*, 283(51), pp. 35393-401.
- Kirschke, C. P. y Huang, L. (2003) 'ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus', *J Biol Chem*, 278(6), pp. 4096-102.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M. H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T. y Maeshima, M. (2004) 'Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis', *Plant Cell Physiol*, 45(12), pp. 1749-58.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T. y Soulimane, T. (2015) 'Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function', *FEBS Lett*, 589(12), pp. 1283-95.
- Kondorosi, E., Mergaert, P. y Kereszt, A. (2013) 'A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors', *Annu Rev Microbiol*, 67, pp. 611-28.
- Koskela, E. V. y Frey, A. D. (2015) 'Homologous recombinatorial cloning without the creation of single-stranded ends: exonuclease and ligation-independent cloning (ELIC)', *Mol Biotechnol*, 57(3), pp. 233-40.
- Kryvoruchko, I. S., Routray, P., Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Tejada-Jiménez, M., Finney, L. A.,

- Nakashima, J., Pislariu, C. I., Benedito, V. A., González-Guerrero, M., Roberts, D. M. y Udvardi, M. K. (2018) 'An iron-activated citrate transporter, MtMATE67, Is required for symbiotic nitrogen fixation', *Plant Physiol*, 176(3), pp. 2315-2329.
- Kuzma, M. M. y Layzell, D. B. (1994) 'Acclimation of soybean nodules to changes in temperature', *Plant Physiol*, 106(1), pp. 263-270.
- La Fontaine, S. y Mercer, J. F. (2007) 'Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis', *Arch Biochem Biophys*, 463(2), pp. 149-67.
- Lacasse, M. J., Douglas, C. D. y Zamble, D. B. (2016) 'Mechanism of selective nickel transfer from HypB to HypA, *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase accessory proteins', *Biochemistry*, 55(49), pp. 6821-6831.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V. y Rosenzweig, A. C. (2000) 'Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone', *Biochemistry*, 39(48), pp. 14720-7.
- Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V. y Rosenzweig, A. C. (2001) 'Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone', *Nat Struct Biol*, 8(9), pp. 751-5.
- Lapinskas, P. J., Lin, S. J. y Culotta, V. C. (1996) 'The role of the *Saccharomyces cerevisiae* CCC1 gene in the homeostasis of manganese ions', *Mol Microbiol*, 21(3), pp. 519-28.
- Larbi, A., Morales, F., Abadía, A. y Abadía, J. (2010) 'Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply', *J Plant Physiol*, 167(4), pp. 255-60.
- LeBauer, D. S. y Treseder, K. K. (2008) 'Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed', *Ecology*, 89(2), pp. 371-9.
- Lee, J., Peña, M. M., Nose, Y. y Thiele, D. J. (2002) 'Biochemical characterization of the human copper transporter Ctrl', *J Biol Chem*, 277(6), pp. 4380-7.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. y Dénarié, J. (1990) 'Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal', *Nature*, 344(6268), pp. 781-4.
- Levi, S. y Rovida, E. (2009) 'The role of iron in mitochondrial function', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1790(7), pp. 629-636.
- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D. y Kaplan, J. (2001) 'CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast', *J Biol Chem*, 276(31), pp. 29515-9.
- Li, L. y Kaplan, J. (2001) 'The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc', *J Biol Chem*, 276(7), pp. 5036-43.
- Lichten, L. A. y Cousins, R. J. (2009) 'Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation', *Annu Rev Nutr*, 29, pp. 153-76.
- Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2009) '*Medicago* N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity', *Plant Cell*, 21(9), pp. 2811-28.

- Lin, S. J. y Culotta, V. C. (1995) 'The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), pp. 3784-8.
- Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V. y Culotta, V. C. (1997) 'A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport', *J Biol Chem*, 272(14), pp. 9215-20.
- Liu, Z., Li, H., Soleimani, M., Girijashanker, K., Reed, J. M., He, L., Dalton, T. P. y Nebert, D. W. (2008) 'Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking', *Biochem Biophys Res Commun*, 365(4), pp. 814-20.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method', *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
- Llamas, A., Otte, T., Multhaupt, G., Mendel, R. R. y Schwarz, G. (2006) 'The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly', *J Biol Chem*, 281(27), pp. 18343-50.
- Long, S. R. (1996) '*Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective', *Plant Cell*, 8(10), pp. 1885-98.
- Lopez-Redondo, M. L., Coudray, N., Zhang, Z., Alexopoulos, J. y Stokes, D. L. (2018) 'Structural basis for the alternating access mechanism of the cation diffusion facilitator YiiP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(12), pp. 3042-3047.
- Lotocka, B., Kopcińska, J. y Skalniak, M. (2012) 'Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae', *Symbiosis*, 58(1-3), pp. 63-72.
- Lu, M., Chai, J. y Fu, D. (2009) 'Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP', *Nat Struct Mol Biol*, 16(10), pp. 1063-7.
- Lu, M. y Fu, D. (2007) 'Structure of the zinc transporter YiiP', *Science*, 317(5845), pp. 1746-8.
- Lubkowitz, M. (2011) 'The oligopeptide transporters: a small gene family with a diverse group of substrates and functions?', *Mol Plant*, 4(3), pp. 407-15.
- Luk, E., Jensen, L. T. y Culotta, V. C. (2003) 'The many highways for intracellular trafficking of metals', *J Biol Inorg Chem*, 8(8), pp. 803-9.
- López-Rayo, S., Nadal, P. y Lucena, J. J. (2015) 'Reactivity and effectiveness of traditional and novel ligands for multi-micronutrient fertilization in a calcareous soil', *Front Plant Sci*, 6, pp. 752.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. y Eide, D. (2000) 'Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*', *EMBO J*, 19(12), pp. 2845-55.
- Mandal, A. K., Cheung, W. D. y Argüello, J. M. (2002) 'Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*', *J Biol Chem*, 277(9), pp. 7201-8.
- Margulis, L. y Chapman, M. J. (1998) 'Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution', *Trends Microbiol*, 6(9), pp. 342-5; discussion 345-6.
- Markossian, K. y Kurganov, B. (2003) Copper Chaperones, Intracellular Copper Trafficking Proteins. Function, Structure, and Mechanism of Action. *Biochem (Mosc)*
- Masuda, H., Ishimaru, Y., Aung, M. S., Kobayashi, T., Kakei, Y., Takahashi, M., Higuchi, K., Nakanishi,

- H. y Nishizawa, N. K. (2012) 'Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition', *Sci Rep*, 2, pp. 543.
- Mathesius, U., Schlaman, H. R., Spalink, H. P., Of Sautter, C., Rolfe, B. G. y Djordjevic, M. A. (1998) 'Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides', *Plant J*, 14(1), pp. 23-34.
- McKey, D. (1994) 'Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle', *Chapter: Advances in Legume Systematics 5: The Nitrogen Factor* pp. 211-228.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. y 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.
- Mealman, T. D., Bagai, I., Singh, P., Goodlett, D. R., Rensing, C., Zhou, H., Wysocki, V. H. y McEvoy, M. M. (2011) 'Interactions between CusF and CusB identified by NMR spectroscopy and chemical cross-linking coupled to mass spectrometry', *Biochemistry*, 50(13), pp. 2559-66.
- Menguer, P. K., Farthing, E., Peaston, K. A., Ricachenevsky, F. K., Fett, J. P. y Williams, L. E. (2013) 'Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1', *J Exp Bot*, 64(10), pp. 2871-83.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A. y Kondorosi, E. (2006) 'Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), pp. 5230-5.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A. R. y Martinoia, E. (2010) 'Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates', *Trends Plant Sci*, 15(1), pp. 40-7.
- Migocka, M., Kosieradzka, A., Papierniak, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Posyniak, E., Garbiec, A. y Filleur, S. (2015a) 'Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells', *J Exp Bot*, 66(3), pp. 1001-15.
- Migocka, M., Małas, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Posyniak, E., Migdal, I. y Szczech, P. (2018) 'Cucumber Golgi protein CsMTP5 forms a Zn-transporting heterodimer with high molecular mass protein CsMTP12', *Plant Sci*, 277, pp. 196-206.
- Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Biskup, R., Garbiec, A. y Marchewka, T. (2015b) 'Cucumber metal tolerance protein CsMTP9 is a plasma membrane H⁺-coupled antiporter involved in the Mn²⁺ and Cd²⁺ efflux from root cells', *Plant J*, 84(6), pp. 1045-58.
- Migocka, M., Papierniak, A., Maciaszczyk-Dziubińska, E., Poździk, P., Posyniak, E., Garbiec, A. y Filleur, S. (2014) 'Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*', *J Exp Bot*, 65(18), pp. 5367-84.
- Miller, R. W., Yu, Z. y Zarkadas, C. G. (1993) 'The nitrogenase proteins of *Rhizobium meliloti*: purification and properties of the MoFe and Fe components', *Biochim Biophys Acta*, 1163(1), pp. 31-41.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L. y Williams, L. E. (2003) 'Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass', *Plant J*, 35(2), pp. 164-76.

- Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M. J., Giralt, E., Salom, D., Mingarro, I., Peñarrubia, L. y Pérez-Payá, E. (2004) 'Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein', *BMC Struct Biol*, 4, pp. 7.
- Mira, H., Vilar, M., Pérez-Payá, E. y Peñarrubia, L. (2001) 'Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH)', *Biochem J*, 357(Pt 2), pp. 545-9.
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. y Obata, H. (2005) 'Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities', *Plant Physiol Biochem*, 43(8), pp. 793-801.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. y Chalot, M. (2007) 'Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity', *BMC Genomics*, 8, pp. 107.
- Montiel, J., Szűcs, A., Boboescu, I. Z., Gherman, V. D., Kondorosi, É. y Kereszt, A. (2016) 'Terminal Bacteroid Differentiation Is Associated With Variable Morphological Changes in Legume Species Belonging to the Inverted Repeat-Lacking Clade', *Mol Plant Microbe Interact*, 29(3), pp. 210-9.
- Moreau, S., Thomson, R. M., Kaiser, B. N., Trevaskis, B., Guerinot, M. L., Udvardi, M. K., Puppo, A. y Day, D. A. (2002) 'GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean', *J Biol Chem*, 277(7), pp. 4738-46.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasour, A. y Richaud, P. (2009) 'AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 149(2), pp. 894-904.
- Morin, I., Gudin, S., Mintz, E. y Cuillel, M. (2009) 'Dissecting the role of the N-terminal metal-binding domains in activating the yeast copper ATPase in vivo', *FEBS J*, 276(16), pp. 4483-95.
- Morrissey, J., Baxter, I. R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D. E. y Guerinot, M. L. (2009) 'The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 21(10), pp. 3326-38.
- Morrissey, J. y Guerinot, M. L. (2009) 'Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome', *Chem Rev*, 109(10), pp. 4553-67.
- Muckenthaler, M. U., Galy, B. y Hentze, M. W. (2008) 'Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network', *Annu Rev Nutr*, 28, pp. 197-213.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. y 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.
- Nutman, P. S. (1959) 'Some observations on root-hair infection by nodule bacteria', *J Exp Bot*, 10(2), pp. 250-263.
- O'Halloran, T. V. y Culotta, V. C. (2000) 'Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions', *J Biol Chem*, 275(33), pp. 25057-60.

- O'Hara, G. (2001) Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: A review. *Anim. Prod. Sci.* 41(3):417-433
- Oldfield, C. J. y Dunker, A. K. (2014) 'Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions', *Annu Rev Biochem*, 83, pp. 553-84.
- Oldroyd, G. E. (2013) 'Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants', *Nat Rev Microbiol*, 11(4), pp. 252-63.
- Oldroyd, G. E. y Downie, J. A. (2008) 'Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes', *Annu Rev Plant Biol*, 59, pp. 519-46.
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A. M., Gyrupe, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V. y Nissen, P. (2007) 'The structural basis of calcium transport by the calcium pump', *Nature*, 450(7172), pp. 1036-42.
- Olsen, L. I. y Palmgren, M. G. (2014) 'Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed', *Front Plant Sci*, 5, pp. 30.
- Paau, A. S., Oro, J. y Cowles, J. R. (1979) 'DNA content of free living rhizobia and bacteroids of various *Rhizobium*-legume associations', *Plant Physiol*, 63(2), pp. 402-5.
- Padilla-Benavides, T., George Thompson, A. M., McEvoy, M. M. y Argüello, J. M. (2014) 'Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF', *J Biol Chem*, 289(30), pp. 20492-501.
- Padilla-Benavides, T., McCann, C. J. y Argüello, J. M. (2013) 'The mechanism of Cu⁺ transport ATPases: interaction with Cu⁺ chaperones and the role of transient metal-binding sites', *J Biol Chem*, 288(1), pp. 69-78.
- Palmer, C. M. y Gueriot, M. L. (2009) 'Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants', *Nat Chem Biol*, 5(5), pp. 333-40.
- Pastore, A. y Puccio, H. (2013) 'Frataxin: a protein in search for a function', *J Neurochem*, 126 Suppl 1, pp. 43-52.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F. J., Blaudez, D., Chalot, M. and Sanders, D. (2007) 'A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20), pp. 8532-7.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Alonso de la Vega, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Igual, J. M., Martínez-Molina, E., Trujillo, M. E. y Velázquez, E. (2015) 'Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov', *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(Pt 4), pp. 1213-9.
- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000) 'Molecular basis of symbiotic promiscuity', *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1), pp. 180-201.
- Peñarrubia, L., Romero, P., Carrió-Seguí, A., Andrés-Bordería, A., Moreno, J. y Sanz, A. (2015) 'Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones', *Front Plant Sci*, 6, pp. 255.
- Pilon, M. (2011) 'Moving copper in plants', *New Phytol*, 192(2), pp. 305-7.
- Podar, D., Scherer, J., Noordally, Z., Herzyk, P., Nies, D. y Sanders, D. (2012) 'Metal selectivity

- determinants in a family of transition metal transporters', *J Biol Chem*, 287(5), pp. 3185-96.
- Popp, C. y Ott, T. (2011) 'Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis', *Curr Opin Plant Biol*, 14(4), pp. 458-67.
- Portnoy, M. E., Schmidt, P. J., Rogers, R. S. y Culotta, V. C. (2001) 'Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mol Genet Genomics*, 265(5), pp. 873-82.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A. y Hennecke, H. (1996) 'A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*', *J Bacteriol*, 178(6), pp. 1532-8.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E. y O'Halloran, T. V. (1997) 'Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1', *Science*, 278(5339), pp. 853-6.
- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenón, V., Andrés-Colás, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Pilon, M. y Peñarrubia, L. (2007) 'Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones', *Biochem Biophys Res Commun*, 354(2), pp. 385-90.
- Puig, S. y Peñarrubia, L. (2009) 'Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants', *Curr Opin Plant Biol*, 12(3), pp. 299-306.
- Pushnik, J. C., Miller, G. W. y Manwaring, J. H. (1984) 'The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis, maintenance and chloroplast biogenesis', *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5), pp. 733-758.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. y O'Halloran, T. V. (1999) 'Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase', *Science*, 284(5415), pp. 805-8.
- Raimunda, D. y Elso-Berberián, G. (2014) 'Functional characterization of the CDF transporter SMc02724 (SmYiiP) in *Sinorhizobium meliloti*: Roles in manganese homeostasis and nodulation', *Biochim Biophys Acta*, 1838(12), pp. 3203-11.
- Raimunda, D., González-Guerrero, M., Leeber, B. W. y Argüello, J. M. (2011) 'The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function', *Biometals*, 24(3), pp. 467-75.
- Ravet, K. y Pilon, M. (2013) 'Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress', *Antioxid Redox Signal*, 19(9), pp. 919-32.
- Recourt, K., van Tunen, A. J., Mur, L. A., van Brussel, A. A., Lugtenberg, B. J. y Kijne, J. W. (1992) 'Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*', *Plant Mol Biol*, 19(3), pp. 411-20.
- Reichmann, D. y Jakob, U. (2013) 'The roles of conditional disorder in redox proteins', *Curr Opin Struct Biol*, 23(3), pp. 436-42.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W. y Masson-Boivin, C. (2016) 'Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts', *Trends Microbiol*, 24(1), pp. 63-75.

- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. y Frommer, W. B. (1995) 'NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*', *FEBS Lett*, 370(3), pp. 264-8.
- Ricachenevsky, F. K., Menguer, P. K., Sperotto, R. A., Williams, L. E. y Fett, J. P. (2013) 'Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies', *Front Plant Sci*, 4, pp. 144.
- Rivas, R., García-Fraile, P. y Velázquez, E. (2009) 'Taxonomy of bacteria nodulating legumes', *Microbiol Insights*, 2, pp. MBI.S3137.
- Robertson, J. G. y Lyttleton, P. (1984) 'Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover', *J Cell Sci*, 69, pp. 147-57.
- Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L. y Guerinot, M. L. (1999) 'A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils', *Nature*, 397(6721), pp. 694-7.
- Robson, R. L. y Postgate, J. R. (1980) 'Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation', *Annu Rev Microbiol*, 34, pp. 183-207.
- Rodríguez-Granillo, A. y Wittung-Stafshede, P. (2008) 'Structure and dynamics of Cu(I) binding in copper chaperones Atox1 and CopZ: a computer simulation study', *J Phys Chem B*, 112(15), pp. 4583-93.
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. y Bleecker, A. B. (1999) 'A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*', *Science*, 283(5404), pp. 996-8.
- Rodríguez-Haas, B., Finney, L., Vogt, S., González-Melendi, P., Imperial, J. y González-Guerrero, M. (2013) 'Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules', *Metallomics*, 5(9), pp. 1247-53.
- Rosenzweig, A. C. y Argüello, J. M. (2012) 'Toward a molecular understanding of metal transport by P(1B)-type ATPases', *Curr Top Membr*, 69, pp. 113-36.
- Rosenzweig, A. C., Huffman, D. L., Hou, M. Y., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A. y O'Halloran, T. V. (1999) 'Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution', *Structure*, 7(6), pp. 605-17.
- Rosenzweig, A. C. y O'Halloran, T. V. (2000) 'Structure and chemistry of the copper chaperone proteins', *Curr Opin Chem Biol*, 4(2), pp. 140-7.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debellé, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C. y 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-Sanz, L., Prieto, R. I., Imperial, J., Palacios, J. M. y Brito, B. (2013) 'Functional and expression analysis of the metal-inducible dmeRF system from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*', *Appl Environ Microbiol*, 79(20), pp. 6414-22.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2006) 'Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride', *CSH Protoc*.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. J. y Peñarrubia, L. (2004) 'The

- Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development', *J Biol Chem*, 279(15), pp. 15348-55.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J. y Peñarrubia, L. (2003) 'Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Mol Biol*, 51(4), pp. 577-87.
- Santi, C., Bogusz, D. y Franche, C. (2013) 'Biological nitrogen fixation in non-legume plants', *Ann Bot*, 111(5), pp. 743-67.
- Santi, S. y Schmidt, W. (2009) 'Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots', *New Phytol*, 183(4), pp. 1072-84.
- Sazinsky, M. H., LeMoine, B., Orofino, M., Davydov, R., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., Hoffman, B. M., Argüello, J. M. y Rosenzweig, A. C. (2007) 'Characterization and structure of a Zn²⁺ and [2Fe-2S]-containing copper chaperone from *Archaeoglobus fulgidus*', *J Biol Chem*, 282(35), pp. 25950-9.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A. R., Kirchner, S., Wipf, D. y von Wirén, N. (2006) 'AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots', *J Biol Chem*, 281(35), pp. 25532-40.
- 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. y Cardona, A. (2012) 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods*, 9(7), pp. 676-82.
- Schmidt, E. D., de Jong, A. J. y de Vries, S. C. (1994) 'Signal molecules involved in plant embryogenesis', *Plant Mol Biol*, 26(5), pp. 1305-13.
- Schmidt, P. J., Kunst, C. y Culotta, V. C. (2000) 'Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1', *J Biol Chem*, 275(43), pp. 33771-6.
- Sellstedt, A. y Richau, K. H. (2013) 'Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*', *FEMS Microbiol Lett*, 342(2), pp. 179-86.
- Senovilla, M., Castro-Rodríguez, R., Abreu, I., Escudero, V., Kryvoruchko, I., Udvardi, M. K., Imperial, J. y González-Guerrero, M. (2018) '*Medicago truncatula* copper transporter 1 (MtCOPT1) delivers copper for symbiotic nitrogen fixation', *New Phytol*, 218(2), pp. 696-709.
- Shahzad, Z., Gosti, F., Frérot, H., Lacombe, E., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. y Berthomieu, P. (2010) 'The five AhMTP1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in *Arabidopsis halleri*', *PLoS Genet*, 6(4), pp. e1000911.
- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P. y Mitra, B. (2000) 'The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*', *J Biol Chem*, 275(6), pp. 3873-8.
- Sherman, F., Fink, G. R. y Hicks, J. B. (1981) Methods in yeast genetics: laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York.
- Shikanai, T. y Fujii, S. (2013) 'Function of PPR proteins in plastid gene expression', *RNA Biol*, 10(9), pp. 1446-56.

- Smith, A. T., Smith, K. P. y Rosenzweig, A. C. (2014) 'Diversity of the metal-transporting P_{1B}-type ATPases', *J Biol Inorg Chem*, 19(6), pp. 947-60.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., Qiu, L. J., Redden, R. J. y Varshney, R. K. (2015) 'Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), pp. 43-104.
- Soma, S., Latimer, A. J., Chun, H., Vicary, A. C., Timbalia, S. A., Boulet, A., Rahn, J. J., Chan, S. S. L., Leary, S. C., Kim, B. E., Gitlin, J. D. y Gohil, V. M. (2018) 'Elesclomol restores mitochondrial function in genetic models of copper deficiency', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(32), pp. 8161-8166.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J. y Barrientos, A. (2012) 'Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core', *Biochim Biophys Acta*, 1817(6), pp. 883-97.
- Suzuki, M., Bashir, K., Inoue, H., Takahashi, M., Nakanishi, H. y Nishizawa, N. K. (2012) 'Accumulation of starch in Zn-deficient rice', *Rice (N Y)*, 5(1), pp. 9.
- Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y. y Kambe, T. (2005) 'Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells', *J Biol Chem*, 280(35), pp. 30956-62.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P. X., Chabaud, M., Ratet, P. y Mysore, K. S. (2008) 'Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*', *Plant J*, 54(2), pp. 335-47.
- Tang, C., Robson, A. D. y 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.
- Tapken, W., Ravet, K. y Pilon, M. (2012) 'Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in *Arabidopsis*', *The Journal of biological chemistry*, 287(22), pp. 18544-18550.
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S. y Cobbett, C. S. (2010) 'Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*', *Metallomics*, 2(8), pp. 556-64.
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Lucas, M. M., Udvardi, M., Imperial, J. y 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., Gil-Díez, P., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K. S., Imperial, J. y González-Guerrero, M. (2017) '*Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency', *New Phytol*, 216(4), pp. 1223-1235.
- Terry, R. E., Soerensen, K. U., Von Jolley, D. y Brown, J. C. (1991) 'The role of active *Bradyrhizobium japonicum* in iron stress response of soybeans', *Plant and Soil*, 130(1), pp. 225-230.
- Udvardi, M. y Poole, P. S. (2013) 'Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses', *Annu Rev Plant Biol*, 64, pp. 781-805.

- Udvardi, M. K. y Day, D. A. (1997) 'Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, pp. 493-523.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. and Mergaert, P. (2010) 'Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis', *Science*, 327(5969), pp. 1122-6.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. y Truchet, G. (1990) 'Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules', *J Bacteriol*, 172(8), pp. 4295-306.
- Vernoud, V., Journet, E.-P. y Barker, D. G. (1999) 'MtENOD20, a Nod factor-inducible molecular marker for root cortical cell activation', *Mol plant microbe interact.* 12(7), pp. 604-614.
- Vessey, J. (2004) Benefits of Inoculating Legume Crops with Rhizobia in the Northern Great Plains. *Crop manag* 3 (1).
- Vincent, J. M. (1970a) A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. *Int Biol Prog.* pp. 164-169.
- Vincent, J. M. (1970b) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Oxford: Blackwell Scientific.* pp. 164-169.
- Vitousek, P. M., Hättenschwiler, S., Olander, L. y Allison, S. (2002) 'Nitrogen and nature', *Ambio*, 31(2), pp. 97-101.
- Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., Inaba, K., Atomi, H., Imanaka, T. y Miki, K. (2015) 'Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe] hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(25), pp. 7701-6.
- Waters, B. M., Chu, H. H., Didonato, R. J., Roberts, L. A., Eisley, R. B., Lahner, B., Salt, D. E. y Walker, E. L. (2006) 'Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds', *Plant Physiol*, 141(4), pp. 1446-58.
- Wei, Y. y Fu, D. (2005) 'Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the *Escherichia coli* metal transporter YiiP (FieF)', *J Biol Chem*, 280(40), pp. 33716-24.
- Wei, Y. y Fu, D. (2006) 'Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP', *J Biol Chem*, 281(33), pp. 23492-502.
- Wei, Y., Shohag, M. J., Yang, X. y Yibin, Z. (2012) 'Effects of foliar iron application on iron concentration in polished rice grain and its bioavailability', *J Agric Food Chem*, 60(45), pp. 11433-9.
- White, P. J. y Broadley, M. R. (2009) 'Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine', *New Phytol*, 182(1), pp. 49-84.
- Williams, L. E. y Mills, R. F. (2005) 'P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants', *Trends Plant Sci*, 10(10), pp. 491-502.
- Wise, A. A., Liu, Z. y Binns, A. N. (2006) 'Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*', *Methods Mol Biol*, 343, pp. 43-53.

- Woeste, K. E. y Kieber, J. J. (2000) 'A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype', *Plant Cell*, 12(3), pp. 443-55.
- Wood, W. B. (1966) 'Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA', *J Mol Biol*, 16(1), pp. 118-33.
- Xi, J., Chen, Y., Nakashima, J., Wang, S. M. and Chen, R. (2013) '*Medicago truncatula* esn1 defines a genetic locus involved in nodule senescence and symbiotic nitrogen fixation', *Mol Plant Microbe Interact*, 26(8), pp. 893-902.
- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A. y Bisseling, T. (2014) 'Fate map of *Medicago truncatula* root nodules', *Development*, 141(18), pp. 3517-28.
- Xiao, Z. y Wedd, A. G. (2002) 'A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1', *Chem Commun (Camb)*, (6), pp. 588-9.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. y Zhang, Y. (2015) 'The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction', *Nat Methods*, 12(1), pp. 7-8.
- Yatsunyk, L. A. y Rosenzweig, A. C. (2007) 'Cu(I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein', *J Biol Chem*, 282(12), pp. 8622-31.
- Yeh, K. Y., Yeh, M. y Glass, J. (2011) 'Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion', *Gastroenterology*, 141(1), pp. 292-9, 299.e1.
- Yoon, T. y Cowan, J. A. (2004) 'Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis', *J Biol Chem*, 279(25), pp. 25943-6.
- Yruela, I. (2009) 'Copper in plants: acquisition, transport and interactions', *Funct Plan Biol*, 36(5), pp. 409-430.
- Yuan, L., Yang, S., Liu, B., Zhang, M. y Wu, K. (2012) 'Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1', *Plant Cell Rep*, 31(1), pp. 67-79.
- Zehr, J. P. y Kudela, R. M. (2011) 'Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems', *Ann Rev Mar Sci*, 3, pp. 197-225.
- Zumft, W. G. (1997) 'Cell biology and molecular basis of denitrification', *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(4), pp. 533-616.