



Área Biología
Subárea Biología Celular y Molecular

Aproximación metodológica para el estudio del control traduccional en plantas de soja noduladas en respuesta a sequía

Tesis de Maestría
Sofía Zardo

Tutora: Dra. Maria Martha Sainz
Co-tutor: Dr. Omar Borsani

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Agronomía - UDELAR

Octubre 2021
Montevideo - Uruguay

Agradecimientos

En primer lugar, le quiero agradecer a mi tutora, Martita, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, por el tiempo dedicado, por los conocimientos compartidos y la paciencia tan necesaria que me transmitió siempre. También a Omar por estar siempre dispuesto a compartirnos sus ideas cuando lo necesitábamos.

Agradecerle a la ANII, por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de maestría y a CSIC grupos que colaboró con la financiación del proyecto.

También agradecerle a todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica: Belu C, Caro, Orne, Pame, Belu L, Pedro S, Esteban, Nico, Fer, Isma, Maite, Mariana, Manu, Pedro D por el lindo grupo que se formó y que muchos de una manera u otra seguimos en contacto.

A Jorge y Omar por permitirme realizar mi trabajo de Tesis en el Laboratorio.

A mi familia y amigos por darme para adelante siempre.

A Nacho, Clarita y Guille que son quienes me dieron las fuerzas para no bajar los brazos y terminar este lindo pero arduo trabajo.

Índice

1	Resumen	5
2	Introducción	6
2.1	Soja	6
2.1.1	Importancia del cultivo de soja en Uruguay y en la región	6
2.1.2	Fijación biológica de nitrógeno	8
2.2	Déficit hídrico y simbiosis rizobio-leguminosa	10
2.3	Regulación post-transcripcional y traduccional de la expresión génica en plantas13	
2.4	Metodologías para el análisis del traductoma: <i>Polysome Profiling</i> y <i>Ribosome Profiling</i>	18
2.4.1	Aislamiento de la fracción polisomal.....	22
3	Objetivos	27
3.1	Objetivo general	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	Materiales y métodos	28
4.1	Reactivos químicos y bioquímicos	28
4.2	Material biológico.....	28
4.2.1	Plantas	28
4.2.2	Microorganismos.....	30
4.3	Clonado de la proteína de fusión HF-RPL18 mediante el sistema <i>Gateway</i>	31
4.4	Transformación de plántulas de soja mediada por <i>A. rhizogenes</i>	34
4.4.1	Transformación de <i>A. rhizogenes</i>	34
4.4.2	Crecimiento de <i>A. rhizogenes</i> recombinante	35
4.4.3	Infección de plántulas de soja con <i>A. rhizogenes</i> para obtener <i>hairy-roots</i> transgénicas.....	35
4.4.4	Confirmación de la obtención de raíces y nódulos transgénicos mediante técnicas moleculares	36

4.5	Ensayo de déficit hídrico en plantas de soja.....	39
4.6	Metodologías para el aislamiento de polisomas	41
4.6.1	Aislamiento de polisomas de raíces de soja mediante la metodología TRAP... 41	
4.6.2	Aislamiento de polisomas de raíces de soja mediante centrifugación diferencial en colchón de sacarosa	43
4.7	Obtención de huellas ribosomales para realizar <i>Ribosome Profiling</i>	47
5	Resultados y Discusión.....	49
5.1	Ensayo de déficit hídrico en plantas de soja.....	50
5.2	Optimización de la purificación de polisomas mediante TRAP a partir de raíces de soja.....	54
5.2.1	Generación de la construcción pK7-GFP/HF-RPL18 y transformación de <i>A. rhizogenes</i>	54
5.2.2	Puesta a punto de la transformación de plantas de soja	57
5.2.3	Ensayos de TRAP.....	60
5.3	Optimización de la purificación de polisomas mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa a partir de raíces de soja y obtención de huellas ribosomales para la metodología de <i>Ribosome Profiling</i>	65
5.4	Perspectivas.....	71
6	Conclusiones	78
7	Bibliografía	79

1 Resumen

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), proceso que es llevado a cabo por plantas leguminosas como la soja, es muy sensible al déficit hídrico. Se ha observado que la tolerancia al déficit hídrico varía según si la planta está o no nodulada y que genotipos de soja identificados como tolerantes pueden perder esta característica cuando se encuentran nodulados. Esto sugiere que existe una respuesta diferencial de la planta al déficit hídrico cuando se encuentra nodulada o no-nodulada que podría explicarse por cambios en la expresión génica. La falta de correlación entre los niveles de ARN mensajeros (ARNm) y proteínas se debe a las distintas etapas de regulación postranscripcional, en particular, a la traducción. Estudios previos han demostrado que la exposición de las plantas a ciertas condiciones ambientales causa una inhibición global de la iniciación de la traducción que se visualiza como una disminución del porcentaje de ARNm asociados a polisomas. El objetivo general planteado en este trabajo fue identificar cambios asociados a la maquinaria traduccional de la raíz de plantas de soja, con el fin de definir posibles genes candidatos que estén involucrados en la respuesta de tolerancia de las plantas al déficit hídrico. Para esto, se llevaron a cabo distintas metodologías para el aislamiento de polisomas de raíces de plantas de soja. En primer lugar, se realizó la metodología TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*) en la cual se purifican los polisomas por afinidad y requiere la generación de plantas transgénicas. En segundo lugar, se procedió a la purificación de los polisomas por medio de ultracentrifugación en colchones de sacarosa, el método convencional. A partir de los polisomas obtenidos por este método, se realizó la purificación de las huellas ribosomales (regiones de los ARNm que están siendo traducidos ocupadas por ribosomas) con la intención de llevar a cabo la metodología de *Ribosome Profiling*. En nuestras condiciones, la metodología que resultó más conveniente para el aislamiento de la fracción polisomal de raíces de plantas de soja fue la ultracentrifugación diferencial en colchones de sacarosa. Logramos aplicar un protocolo mediante el cual obtuvimos ARN de alta calidad a partir de las fracciones polisomales para su posterior secuenciación. Contar con esta metodología puesta a punto en nuestro sistema de estudio es muy relevante ya que nos permitirá en el corto plazo identificar genes sujetos a control traduccional que estén teniendo un rol clave en distintas condiciones ambientales, en particular, en plantas de soja noduladas y bajo déficit hídrico.

2 Introducción

2.1 Soja

2.1.1 Importancia del cultivo de soja en Uruguay y en la región

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa originaria del sudeste asiático cuyo cultivo es muy importante a nivel mundial siendo una fuente de aceites y proteínas tanto para el ser humano como para el ganado. Además de ser un insumo clave para la industria alimenticia, también es utilizada como materia prima para la producción de biocombustibles. En las últimas décadas, el Cono Sur de América Latina se ha transformado en el principal productor mundial de soja. Su rápida expansión la ha convertido en el cultivo precursor del modelo de agronegocio en la región. La soja y sus derivados (aceites, *pellets*, harinas) son el principal rubro agroindustrial exportador de Argentina, el segundo de Uruguay y uno de los dos mayores de Brasil (Isidoro Losada et al., 2014). Además, las leguminosas tienen la gran ventaja de ser un método económico de fertilización nitrogenada gracias a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno que forman órganos especializados (nódulos) en sus raíces llevando a cabo un método natural de fertilización (Van Heerden et al., 2007).

El cultivo de soja comenzó a ganar cada vez mayor relevancia en Uruguay a partir del crecimiento de la demanda mundial liderada por China. Las nuevas tecnologías de siembra, de semillas y, las inversiones extranjeras en el sector, promovieron un aumento en el área sembrada y en el rendimiento de los cultivos. Actualmente, los principales productos de exportación dentro de la agroindustria en nuestro país son la carne bovina, seguida por celulosa y soja (**Figura 1**) (Uruguay XXI, 2020). Desde 2003 es el cultivo de mayor área sembrada en el país, ocupando aproximadamente 917 mil hectáreas cultivadas según el Anuario Estadístico Agropecuario 2020 referente a la zafra 2019/2020 (MGAP-DIEA, 2020).

Entre los factores ambientales que más inciden en el desarrollo y rendimiento de los cultivos de soja se encuentra la sequía (Abdel-Haleem et al., 2011). De hecho, la sequía del verano 2017-2018 impactó significativamente en la producción de soja en Uruguay, disminuyendo su rendimiento en un 51% aun cuando el área sembrada había aumentado un 10% en dicha zafra (Uruguay XXI, 2019). Estas pérdidas en los rendimientos se deben a que el constante cambio de

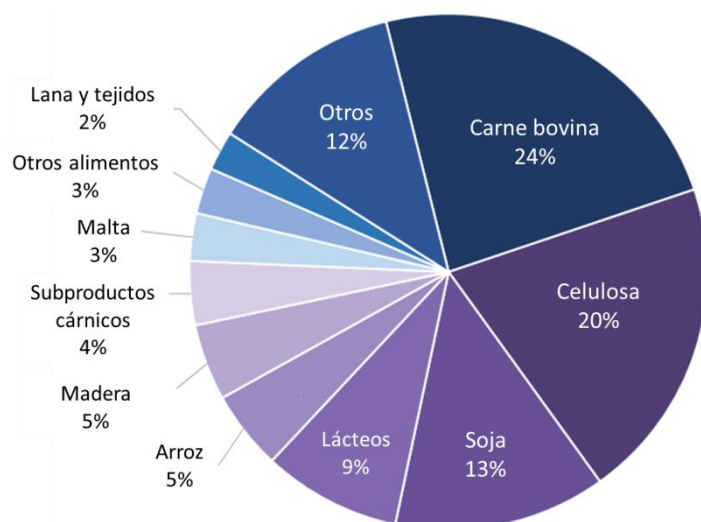


Figura 1. Principales productos de exportaciones agroindustriales en Uruguay en el año 2019. El principal producto de exportación dentro de la agroindustria del Uruguay fue la carne bovina, seguido por celulosa y soja. [Gráfica extraída y editada de Uruguay XXI, 2020, elaborada en base a datos de la Dirección Nacional de Aduanas, Nueva Palmira y Montes del Plata].

las condiciones ambientales afectan el metabolismo celular, influyendo en el crecimiento y la productividad de las plantas. Por lo tanto, para predecir el rendimiento de la soja es imprescindible considerar factores externos como la sequía, las inundaciones, el calor, el frío, las heladas y el estrés por rayos UV. En particular, en Uruguay, la soja presenta una alta variabilidad interanual en el rendimiento asociada a períodos de déficit hídrico. Esto es debido a que nuestros suelos presentan una capacidad de almacenamiento de agua disponible menor a la requerida por el cultivo durante su ciclo (Sawchik y Ceretta, 2005), sumado a una errática cantidad y distribución de las precipitaciones (Castaño et al., 2011).

La sequía es el estrés ambiental más significativo para la producción de cultivos a nivel mundial (Jumrani and Bhatia, 2019). Desafortunadamente, se predice que el aumento de las temperaturas ocasionado por el calentamiento global dará como resultado una mayor frecuencia y gravedad a los episodios de sequía. A su vez, en soja, la fijación de nitrógeno (N) llevada adelante gracias a la asociación simbiótica de la planta con la bacteria (rizobio) es de los procesos fisiológicos más sensibles a la sequía, seguido de otros procesos como la fotosíntesis. Por esta razón, en el presente trabajo de Tesis nos propusimos profundizar en el efecto metabólico que provoca la sequía en genotipos de soja en condiciones de nodulación.

2.1.2 Fijación biológica de nitrógeno

El N es uno de los macronutrientes más limitantes para el crecimiento de las plantas, siendo componente de los aminoácidos y comprendiendo el 16% de las proteínas totales vegetales, además de cumplir un rol central en el metabolismo celular (Frink et al., 1999; López-Arredondo et al., 2017).

La fijación biológica de Nitrógeno (FBN) y los procesos microbiológicos que convierten el N atmosférico (N_2) en N asimilable por la planta ofrecen alternativas económicas y ambientalmente amigables reduciendo la utilización de los fertilizantes químicos. La excesiva aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados ha conducido a una alteración en el ciclo ambiental del N, como por ejemplo una constante acumulación de nitratos en el suelo y en el agua (Gutiérrez-Boem et al., 2004; Non Renseigné and Iqbal, 2007) o un aumento de óxidos de nitrógeno en el ambiente (Velthof et al., 2009). Dicho esto, para alcanzar una agricultura sustentable se debe encontrar alternativas ambientalmente amigables a los fertilizantes químicos.

El proceso de FBN se da a partir de los rizobios, bacterias gram negativas presentes en el suelo, que pueden fijar (reducir) el N_2 a amonio (NH_4^+) dejándolo de esta forma disponible para que sea asimilado por las plantas mediante el establecimiento de una relación simbiótica con la planta hospedera. Los rizobios constituyen un grupo muy heterogéneo de bacterias pertenecientes a cuatro familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae (Madigan et al., 2012). Solamente algunos géneros pertenecientes a estas familias son capaces de realizar el proceso de FBN: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Lindström et al., 2010). Desde el año 2001 se concen además rizobios pertenecientes al orden Burkholderiae, género Paraburkholderia, Cupriavidus y Trinickia dentro de las betaproteobacterias (Andrews & Andrews, 2017; Estrada de los Santos, 2018; Gaddes et al., 2020). La asociación rizobio-leguminosa es muy específica, cada cepa de rizobio tiene un rango de huésped definido, que puede ser muy limitado o muy amplio (Perret et al., 2000). Sin embargo, una cepa de rizobio solo puede ser considerada efectiva si es capaz de fijar N en los nódulos de la leguminosa huésped.

A diferencia de las cianobacterias y las bacterias del género *Frankia*, los rizobios no pueden generar por si mismos un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la FBN.

Por esto, para llevar a cabo dicho proceso, estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de las plantas leguminosas e interactuar con éstas, promoviendo una serie de respuestas en la planta que desencadenarán la formación de un órgano nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

Para el establecimiento de una simbiosis efectiva se necesitan dos clases principales de genes bacterianos simbióticos: genes de nodulación y genes de fijación del N_2 . Los genes de nodulación (por ejemplo, *nodABC*) codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis y de la secreción de los factores Nod, que son lipo-quitooligosacáridos (LCOs, según sus siglas en inglés) inducidos por los flavonoides de la planta para permitir el proceso de infección y formación del nódulo (**Figura 2**). La estructura de los LCOs varía en la longitud del esqueleto del oligosacárido, en el tipo de ácido graso en el extremo no reductor y en el número y tipos de grupos sustituyentes que tiene la molécula.

Los genes de la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) incluyen los genes estructurales de la nitrogenasa, enzima responsable de la fijación del N_2 que está compuesta por dos metaloproteínas: una ferroproteína o dinitrogenasa reductasa y una ferromolibdoproteína o dinitrogenasa. La dinitrogenasa reductasa es un homodímero, codificado por el gen *nifH*, que contiene cuatro átomos de Fe y un centro 3Fe-4S. La dinitrogenasa es un tetrámero, codificado por el gen *nifDK*, con dos tipos de centros: centro P (4Fe-4S) y cofactor FeMoco, que representa el sitio activo de la enzima donde se reduce el sustrato (Laranjo et al., 2014).

La nitrogenasa se daña de manera irreversible cuando se expone al O_2 . Es por ello que la planta induce tres procesos para producir un entorno microaeróbico alrededor de los rizobios fijadores de N_2 en los nódulos: (1) una barrera a la difusión gaseosa en los nódulos: las capas externas de células limitan la tasa de flujo de O_2 al tejido central infectado; (2) los bacteroides y las mitocondrias vegetales: con sus altas tasas de respiración consumen O_2 tan rápido como pueda entrar en los nódulos; y (3) la leghemoglobina: tiene una alta afinidad para unirse al O_2 en el citoplasma y entregarlo rápidamente a las mitocondrias y a los bacteroides (L'taief et al., 2007).

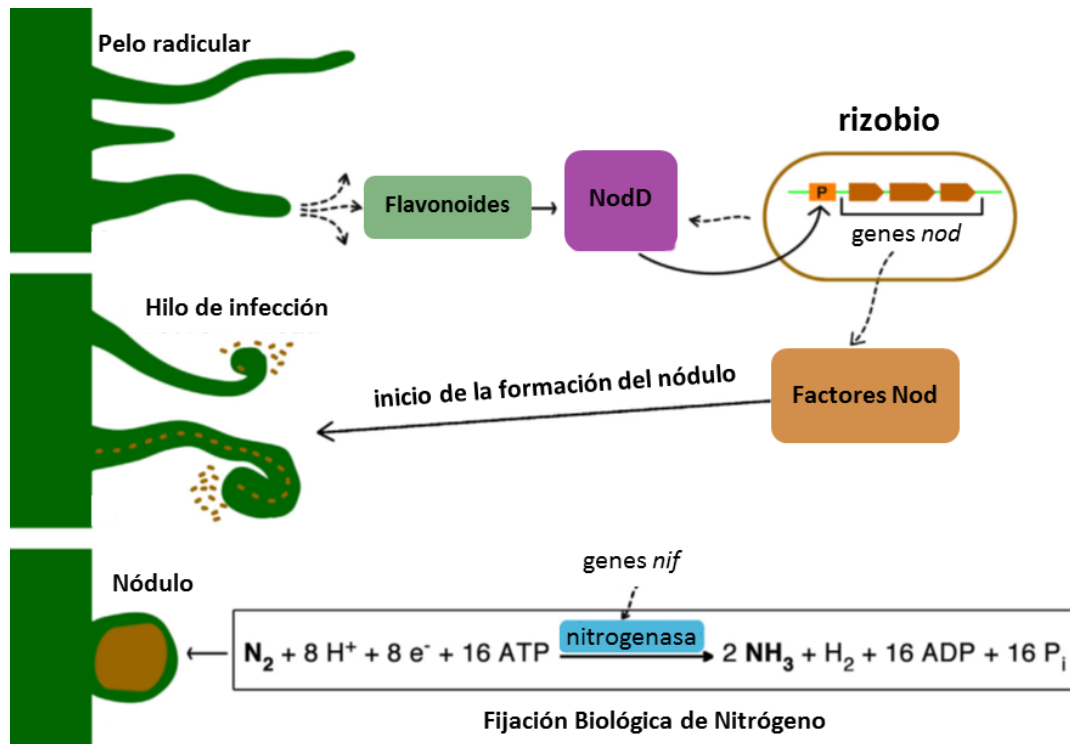


Figura 2. Esquema de los procesos de nodulación y fijación biológica de nitrógeno. Se muestra el intercambio de señales entre los rizobio y los pelos radiculares de una planta leguminosa. [Adaptado de Laranjo et al., 2014].

2.2 Déficit hídrico y simbiosis rizobio-leguminosa

Se conoce que la contribución de la simbiosis al crecimiento y producción de las leguminosas es altamente sensible a condiciones ambientales adversas. Factores ambientales severos tales como déficit hídrico (Gil-Quintana et al., 2015; Kunert et al., 2016; Mnasri et al., 2007; Postma et al., 1989), temperatura elevada (Aranjuelo et al., 2007; Hungria et al., 1993; Montañez et al., 1995), salinidad (Talibart et al., 1997; Vanderlinde et al., 2010), acidez del suelo (Miransari et al., 2013) y el aumento de los niveles de CO_2 (Prévost et al., 2010), afectan drásticamente el proceso simbiótico y por lo tanto juegan un rol en la determinación de la cantidad de N asimilado por las leguminosas en el campo.

Entender cómo la fijación simbiótica de N responde a los cambios medioambientales es crucial para mejorar el rendimiento de las plantas leguminosas y lograr una agricultura sustentable. Como consecuencia del cambio climático se predice un aumento en el número de eventos de sequía (Rosenzweig et al., 2008). En fisiología vegetal, el déficit hídrico puede definirse como

una reducción del contenido de agua de una célula o tejido por debajo del nivel óptimo. Una disminución significativa del contenido de agua en el suelo puede provocar una deficiencia de agua a nivel de la planta. La tolerancia a la sequía puede definirse como la capacidad que manifiesta una especie de sobrevivir, mantener o disminuir en baja proporción su crecimiento y desarrollo en estas condiciones ambientales. Aún no se conoce con certeza el mecanismo fundamental de tolerancia al estrés por deficiencia de agua. El crecimiento celular es el proceso fisiológico que primero se ve afectado a medida que el contenido de agua de la célula baja, seguido de la inhibición de la biosíntesis de proteínas y de la pared celular, y fotosíntesis (González et al., 2015). En el caso de las leguminosas crecidas en condiciones simbióticas, uno de los primeros efectos del déficit hídrico es la disminución en la tasa de FBN. Si bien el mecanismo de inhibición aún no está claro, es conocido que ocurre incluso antes de la disminución de la tasa fotosintética (González et al., 2015), y se ha propuesto que está relacionada con otros factores como son: la limitación de oxígeno (O₂), la escasez de carbono y la retroalimentación de N, el estrés oxidativo (generado por la limitación de O₂) y el metabolismo del azufre (Marino et al., 2013).

Por otro lado, en soja, se ha descrito que existen diferencias genóticas en cuanto a la sensibilidad frente al déficit hídrico de la FBN (King et al., 2014). Para la evaluación de genotipos que toleren el déficit hídrico, los programas de mejoramiento necesitan incorporar el proceso de fijación de N como variable, identificando entre genotipos de características fenotípicas de fácil medición correlacionadas al proceso de FBN. Estudios previos realizados en el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía demostraron que el comportamiento de distintos genotipos de soja sometidos a déficit hídrico varía en función si la planta está o no nodulada. Se observó, en particular, que genotipos evaluados como tolerantes a déficit hídrico disminuyen la capacidad de tolerar el estrés cuando se encuentran nodulados. Esto podría explicarse ya que el establecimiento de la simbiosis, y por tanto de la nodulación, altera el metabolismo de las plantas a distintos niveles. La alta demanda de carbono requerida para la formación del nódulo puede alterar la tolerancia frente al déficit hídrico.

La sequía tiene un impacto importante en la microbiología del suelo, desde una reducción de la disponibilidad de agua alrededor de las partículas de suelo hasta el incremento de la concentración de sal, provocando estrés salino, lo que genera un efecto negativo en el crecimiento bacteriano. Bajo condiciones de falta de agua, disminuye la viabilidad de la mayoría de rizobios capaces de establecer simbiosis con las plantas leguminosas (Mnasri et al., 2007; Orchard and Cook, 1983; Postma et al., 1989). A su vez, el efecto del déficit hídrico sobre la FBN

ocurre en diferentes etapas de la interacción simbiótica, tanto en las etapas tempranas de la infección alterando la secreción de flavonoides y de los factores Nod como durante el desarrollo y el funcionamiento del nódulo (Estévez et al., 2009).

Dos factores que juegan un rol fundamental en este aspecto es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la defensa antioxidante (Chang et al., 2009). En los últimos años han surgido evidencias que revelan la participación del óxido nítrico (NO) en las distintas etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa (Boscari et al., 2013; Meilhoc et al., 2011; Signorelli et al., 2020). La disminución de la fijación de N en condiciones de estrés abiótico se correlaciona con una modificación en el balance redox y una fuerte disminución de la defensa antioxidante (Escuredo et al., 1996; Gogorcena et al., 1997) y del flujo de carbono (Gálvez et al., 2005; Matamoros et al., 1999). Asimismo, se ha visto que esta disminución de la FBN está asociada a la modificación de la presión parcial de oxígeno en el nódulo. En soja, la sequía y el estrés salino provocan un descenso en la actividad nitrogenasa que está vinculado con una disminución en la permeabilidad de oxígeno del nódulo (Durand et al., 1987; Serraj et al., 1994).

La mayoría de los estudios se han abordado tradicionalmente asumiendo una regulación local de la FBN a nivel de nódulo. Sin embargo, más recientemente Larrainzar et al. 2014, han sugerido la existencia de un mecanismo de regulación sistémica, donde mediante estudios de *split-root systems* demuestran una supresión de la nodulación de larga distancia y un control sistémico de la FBN en función del *status* del N en la planta. Estos autores concluyen que estreses abióticos tales como la sequía a corto plazo generan una inhibición local de la FBN; sin embargo, estreses a largo plazo conducen a una respuesta generalizada afectando toda la planta, dependiendo de la naturaleza y la intensidad del estrés (Larrainzar et al., 2014). En el mismo estudio, confirman una interconexión entre la inhibición de FBN, la limitación del carbono, la alteración del balance redox del nódulo y la acumulación de compuestos nitrogenados. Sin embargo, los mecanismos que existen detrás de estas respuestas y la secuencia de eventos que conducen finalmente a la regulación a la baja de la FBN aún son poco conocidos. Lograr una mayor comprensión sobre la respuesta de la FBN frente a condiciones ambientales desfavorables es particularmente importante tanto para la agricultura como para la preservación de los agroecosistemas.

2.3 Regulación post-transcripcional y traduccional de la expresión génica en plantas

El proceso de expresión génica puede ser regulado en todas sus etapas, ya sea en la iniciación de la transcripción (regulación transcripcional), en eventos post-transcripcionales (regulación post-transcripcional) como el procesamiento del ARN, en la determinación del número de proteínas que se formarán a partir de un mismo ARN mensajero (ARNm) (regulación traduccional), o en la modificación post-traduccional y en la degradación de proteínas (Bucca et al., 2018).

En eucariotas, la transcripción de los ARNm es llevada a cabo por la ARN polimerasa II. Los ARN generados sufren un proceso de maduración en el cual se les agrega un nucleótido modificado en el extremo 5' (caperuza 5'), se les remueven los intrones y se les corta el extremo 3' donde se agrega la cola poli A (poliadenilación). Durante este proceso de maduración, los ARNm se asocian con proteínas nucleares de unión al ARN para formar complejos mensajero-ribonucleoproteínas (mRNPs) que son transportados a través de los poros nucleares hacia el citoplasma, donde los ARNm son sujetos a un control de calidad para identificar aquellos aberrantes y marcarlos para su degradación. Los ARNm citoplasmáticos pueden ser reclutados por la maquinaria traduccional, almacenados como mRNPs o secuestrados en los denominados cuerpos de procesamiento (cuerpos P) (**Figura 3**) (Van Hoof and Wagner, 2011). Si bien la actividad de los cuerpos P suele asociarse con la degradación de los ARNm, se ha reportado en levaduras y mamíferos, no así en plantas, que algunos ARNm son capaces de salir de estos cuerpos y re-iniciar la traducción (Bhattacharyya et al., 2006; Brengues et al., 2005).

Otro mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión génica es el que se da mediante ARN pequeños endógenos. Un tipo de estos ARN son los microARN (miARN) que constan de entre 19 y 25 nucleótidos y que actúan sobre los mRNA clivándolos, inhibiendo su traducción, o acelerando su degradación (Jones-Rhoades et al., 2006; Reynoso et al., 2013). Los miRNAs son sintetizados mediante un ARN precursor que luego es procesado para generar un miRNA maduro duplicado. En el citoplasma, una hebra simple del miRNA maduro es incorporada al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El principal componente del complejo RISC es parte de la familia de proteínas ARGONAUTA (AGO) (**Figura 3**) (Lanet et al., 2009; Reynoso et al., 2013). A pesar de que el principal mecanismo de acción de los miRNA en plantas se considera que es el corte de los ARN, se ha encontrado que se da la asociación de AGO1 y de distintos miRNAs a polisomas (ARNm unido a dos o más ribosomas), sugiriendo que los miRNA también pueden actuar a nivel de la inhibición traduccional en plantas (Lanet et al., 2009).

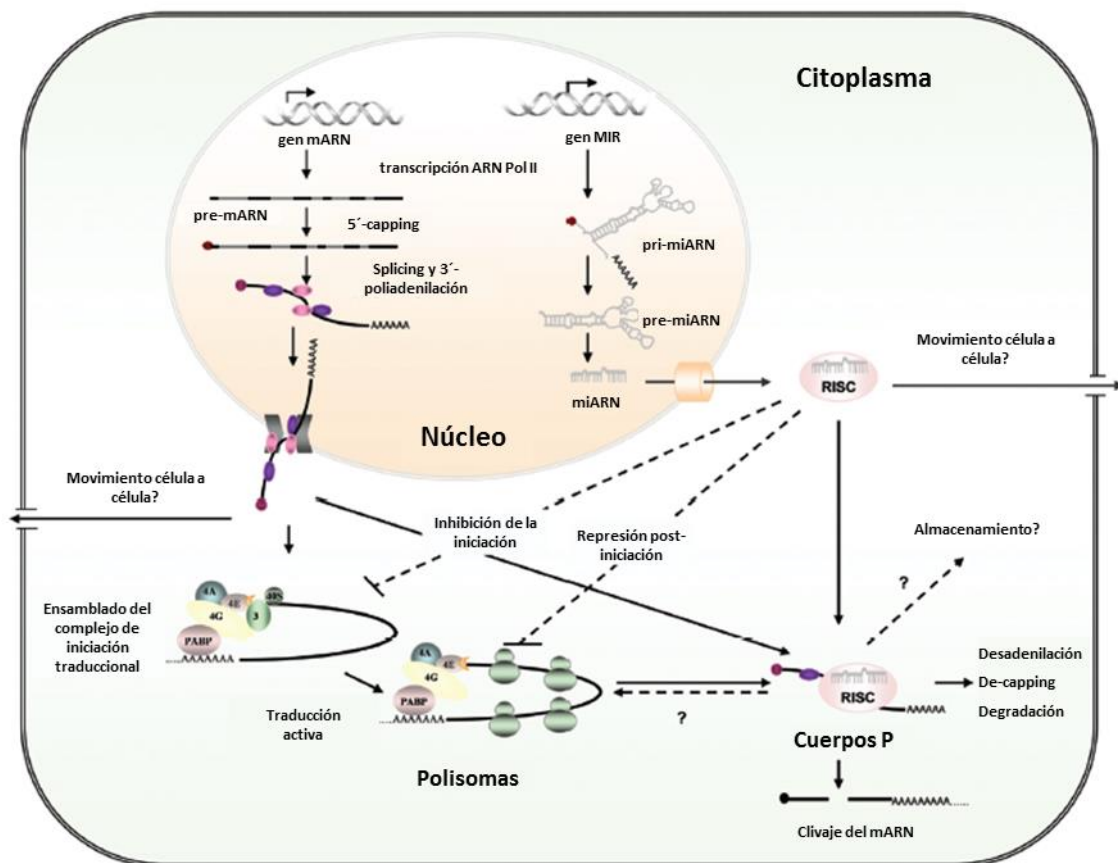


Figura 3. Descripción general de la regulación postranscripcional en plantas. Los ARNm de plantas son transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa II (ARN Pol II) como ARNm primarios (pre-ARNm) que experimentan eventos de procesamiento como la adición de una caperuza m7GpppN al extremo 5' (5' *capping*), eliminación de intrones (splicing del ARN), escisión y poliadenilación del extremo 3' y la asociación con proteínas de unión a ARN nuclear antes de ser exportados al citoplasma a través de los poros nucleares. Los ARNm citoplasmáticos se asocian al complejo de pre-iniciación de la traducción 43S, que está compuesto por la subunidad ribosómica 40S, factores de iniciación eucariotas (eIF4E, eIF4G, eIF3 y eIF4A) y la proteína de unión a poliA (PABP). Posteriormente, el ARNm comienza a traducirse activamente en polisomas (ARNm unido a varios ribosomas). La interacción entre eIF4G y PABP promueve la circularización del complejo ribonucleoproteico, que facilita el reciclaje de ribosomas y la reiniciación de la traducción. Por otro lado, algunos ARNm pueden moverse a células adyacentes a través de plasmodesmos, dirigirse a cuerpos P para *de-capping*, desadenilación y degradación, o almacenarse en complejos ribonucleoproteicos reprimidos traduccionalmente. Los genes MIR son transcritos por la ARN Pol II para producir miARNs primarios (pri-miARNs) poliadenilados y con caperuza en el extremo 5'. Los pri-miARNs se procesan primero en precursores llamados pre-miARN, y luego en dúplex de ARN maduros cortos. Los miARN se exportan al citoplasma y la hebra única de los miARN maduros se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que podría actuar mediante escisión del ARN o inhibición de la traducción en las etapas de iniciación o post-iniciación [Adaptado de Reynoso et al., 2013].

Las plantas responden a las limitaciones ambientales regulando la expresión de genes de respuesta al estrés tanto de forma transcripcional, post-transcripcional o mediante una combinación de ambos niveles. Estos mecanismos de regulación proporcionan la flexibilidad y

versatilidad que se requiere para coordinar la adaptación de las células a las cambiantes condiciones ambientales.

Las respuestas de las plantas leguminosas al déficit hídrico han sido analizadas utilizando diferentes metodologías basadas en la transcriptómica, en la metabolómica, en la proteómica y en la fisiología general de la planta (Osakabe et al., 2014; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Sullivan and Eastin, 1974; Sun et al., 2020). Sin embargo, algunos aspectos de la expresión génica han sido poco estudiados debido a limitaciones técnicas o al alto costo y al tiempo requerido para evaluar la contribución a cada nivel de regulación. Muchos autores han observado variaciones en la abundancia de ARNm en plantas sometidas a distintas condiciones de estrés, en particular, déficit hídrico (Betti et al., 2012; Clement et al., 2008; Gong et al., 2010; Zhu, 2002). A su vez, estudios con diferentes cultivos de leguminosas y plantas modelo en simbiosis han evidenciado la variabilidad de las respuestas metabólicas en los nódulos cuando las plantas están expuestas a la sequía (González et al., 2015). Los cambios en el transcriptoma han sido abordados en diferentes etapas de la asociación rizobio-leguminosa mediante tecnologías de secuenciación del ARN. Estos estudios permitieron la identificación de cientos o miles de genes cuyos niveles de ARNm en estado estacionario aumentan o disminuyen con la infección bacteriana o en nódulos en comparación con raíces de plantas no infectadas (Libault et al., 2010; Mitra and Long, 2004).

En este sentido, el análisis de la expresión del genoma se ha centrado principalmente en determinar la abundancia de los transcritos a través de microarreglos (“microarrays”; Brown and Botstein, 1999; Krishnamurthy et al., 2018) o, más recientemente, mediante la secuenciación del ARN (Denyer et al., 2019; Shulse et al., 2019; Wang et al., 2009). Sin embargo, los enfoques basados en transcriptomas no distinguen entre los ARNm que se están traduciendo activamente, de los que por el contrario son almacenados como mRNPs o de aquellos que están marcados para su degradación. El aumento en los niveles en estado estacionario de un ARNm no necesariamente se correlaciona con un aumento en la abundancia o actividad de la proteína codificada (tomando en cuenta los mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión génica) que en la mayoría de los casos es el producto funcional de dicha expresión génica (Reynoso et al., 2013). Se ha demostrado en distintos organismos que los diferentes niveles de regulación postranscripcional de la expresión génica contribuyen significativamente a esta falta de correlación entre los niveles de transcrito y proteína (Gygi et al., 1999; Kawaguchi et al., 2004; Larsson et al., 2013; Vogel and Marcotte, 2013) y que no hay

una dependencia entre los cambios a nivel del transcriptoma y los que ocurren a nivel de los ARNm que están siendo activamente traducidos (traductoma) (Tebaldi et al., 2012).

La lógica en la que se basan muchos experimentos de *profiling* es que los cambios coordinados en la expresión que tienen lugar en el curso de un proceso biológico permiten la identificación de genes y vías funcionalmente importantes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el efecto del programa de expresión génica es el resultado de cambios en los niveles de proteínas, que generalmente se deben a la regulación coordinada de la transcripción, el procesamiento de los mARNs y la traducción (Ingolia, 2014). El análisis directo del traductoma permite una medición más precisa y completa de la expresión génica en la célula que la que se obtiene cuando solo se analizan los niveles de ARNm (Ingolia, 2014; Lukoszek et al., 2016; Wang et al., 2013). No obstante, la información obtenida a partir del análisis de la traducción y de los niveles de ARNm es complementaria. La comparación de los datos de traductomas y transcriptomas permite distinguir entre los distintos niveles de regulación ya que la inducción transcripcional resulta en un aumento concomitante de la abundancia de los ARNm y de la síntesis proteica; en cambio, la activación traduccional se manifiesta como un aumento de la síntesis proteica sin el correspondiente cambio en la abundancia de los ARNm (Ingolia, 2014; Sablok et al., 2017) (**Figura 4**).

La regulación de la traducción tiene un rol crucial en la modulación de la expresión génica (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Este proceso puede ser regulado en cada una de sus tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Si bien existen algunos ejemplos de inhibición selectiva de las etapas de elongación y terminación de la traducción en plantas (Onouchi et al., 2008), en la mayoría de los casos la regulación traduccional ocurre en la etapa de iniciación (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). Esta etapa, que es un proceso muy selectivo, requiere la formación del complejo de pre-iniciación 43S que se une a la caperuza en 5' del ARNm y lo escanea en la dirección 5'-3' hasta encontrar un codón de iniciación (generalmente AUG) con un contexto de secuencia adecuado. En ese punto, se une la subunidad 60S para formar el complejo 80S, es decir, el ribosoma, que continúa con la etapa de elongación. El reclutamiento secuencial de ribosomas al ARNm resulta en la formación de polisomas (Reynoso et al., 2013). Una disminución en la tasa de iniciación o re-iniciación de la traducción resulta en una reducción de la cantidad de ribosomas asociados a un ARNm. Esta disminución se visualiza como una disminución de los polisomas de gran tamaño (muchos ribosomas asociados a un ARNm) y un incremento de polisomas pequeños (pocos ribosomas asociados a un ARNm), monosomas o subunidades ribosomales libres.

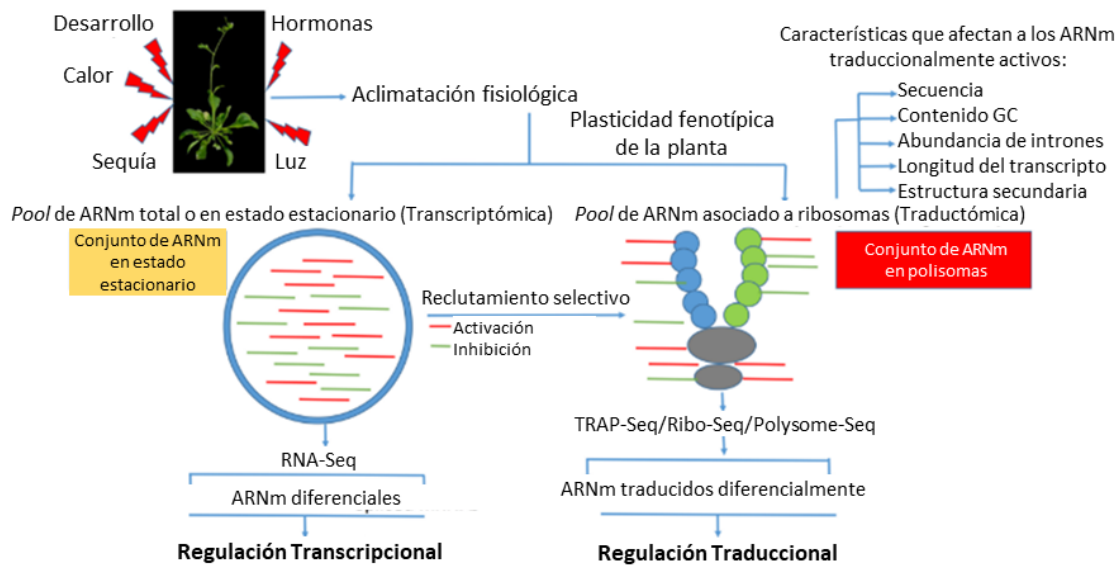


Figura 4. Esquema de dos conjuntos de ARN mensajeros (ARNm), uno sujeto a control transcripcional y otro sujeto a control traduccional en plantas en distintas condiciones de estrés abiótico y de patrones de desarrollo. La inducción de las distintas condiciones de estrés o los cambios en el patrón de desarrollo requiere un conjunto específico de ARNm regulados transcripcionalmente, representado por los ARNm en estado estacionario, y de ARNm traduccionalmente activos, representados por los ARNm unidos a ribosomas. La regulación diferencial de estos ARNm en estado estacionario y aquellos activos traduccionalmente juega un rol importante en la definición de la plasticidad fenotípica de la planta en ambientes estresantes. Para la identificación de los ARNm sujetos a control transcripcional se sigue la metodología RNA-Seq. Los ARNm sujetos a control traduccional, que representan el subconjunto del *pool* de ARNm que están unidos a ribosomas, pueden ser identificados mediante distintas metodologías que involucran en primer lugar la obtención o purificación de la fracción polisomal y luego secuenciación masiva y análisis (TRAP-Seq, Ribo-Seq, Polysome-Seq) [Adaptado de Sablok et al., 2017].

Existen pocos estudios sobre el análisis de traductomas en leguminosas (Coate et al., 2014; Reynoso et al., 2013; Traubenik et al., 2020) y menos se conoce sobre la regulación de la traducción en el contexto de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, tan importante desde el aspecto agro-ecológico. Con el fin de poder analizar la regulación génica a nivel traduccional se han desarrollado distintas metodologías basadas en la obtención de la fracción polisómica en primer lugar y, a continuación, en la purificación e identificación de esos ARNm que se encontraban como complejos poliribosomales. De esta manera se logra seleccionar aquellos ARNm traduccionalmente activos. Aplicar la metodología adecuada que permita este tipo de aproximaciones experimentales en nuestras condiciones de laboratorio y sistema de estudio es parte de los objetivos de esta tesis.

2.4 Metodologías para el análisis del traductoma: *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling*

Los métodos tradicionales empleados para el estudio de la expresión génica permiten la cuantificación de los niveles estacionarios de ARNm, como por ejemplo el secuenciado masivo de los ARNm de un momento celular específico. Sin embargo, estos métodos no brindan una información exacta de lo que está sucediendo en la célula ya que, como se mencionó anteriormente, la expresión génica presenta múltiples niveles de regulación y por lo tanto no siempre los niveles de ARNm están correlacionados con los niveles de proteínas. Entre estos niveles, la regulación de la traducción gobierna la producción de proteínas en respuesta a distintas situaciones fisiológicas y patológicas. En consecuencia, se ha visto que alrededor del 40% de la variación en los niveles de proteínas se debe al control traduccional (Schwanhüusser et al., 2011). Es así que el estudio de la traducción proporciona un mejor entendimiento de la regulación de la expresión génica y puede explicar las diferencias que se encuentran entre estudios transcriptómicos y proteómicos, ya que el subgrupo de ARNm que están siendo activamente traducidos refleja la lectura funcional del genoma en determinada célula o tejido y en determinado momento (Chassé et al., 2017).

En particular, el inicio de la traducción es generalmente considerada la etapa limitante en el proceso de síntesis de proteínas (Branco-Price et al., 2005; Kawaguchi et al., 2004). Por tanto, el número de ribosomas cargados en el transcripto es representativo del balance de las velocidades de iniciación, elongación y terminación de la traducción, y puede ser un indicador robusto de la eficiencia de la traducción (Bucca et al., 2018). En este sentido, se han desarrollado metodologías que permiten monitorear el proceso combinando la purificación de la fracción polisomal con secuenciación masiva de los ARNm asociados con el fin de identificar aquellos que están siendo activamente traducidos. Algunas de estas metodologías que permiten estudiar específicamente el traductoma son el *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling*, que requieren de la fracción polisomal del tejido o célula de interés como material de partida (**Figura 5**).

En la mayoría de los casos, el nivel de ARNm en polisomas está correlacionado con su tasa de traducción. Una reducción en el número de moléculas de ARNm en complejos polisomales y en el número de ribosomas por ARNm está correlacionando con una restricción en la etapa de iniciación de la traducción (Mustroph et al., 2009). Los ARNm que no continuarán con su traducción son secuestrados en complejos mRNPs donde serán estabilizados o degradados

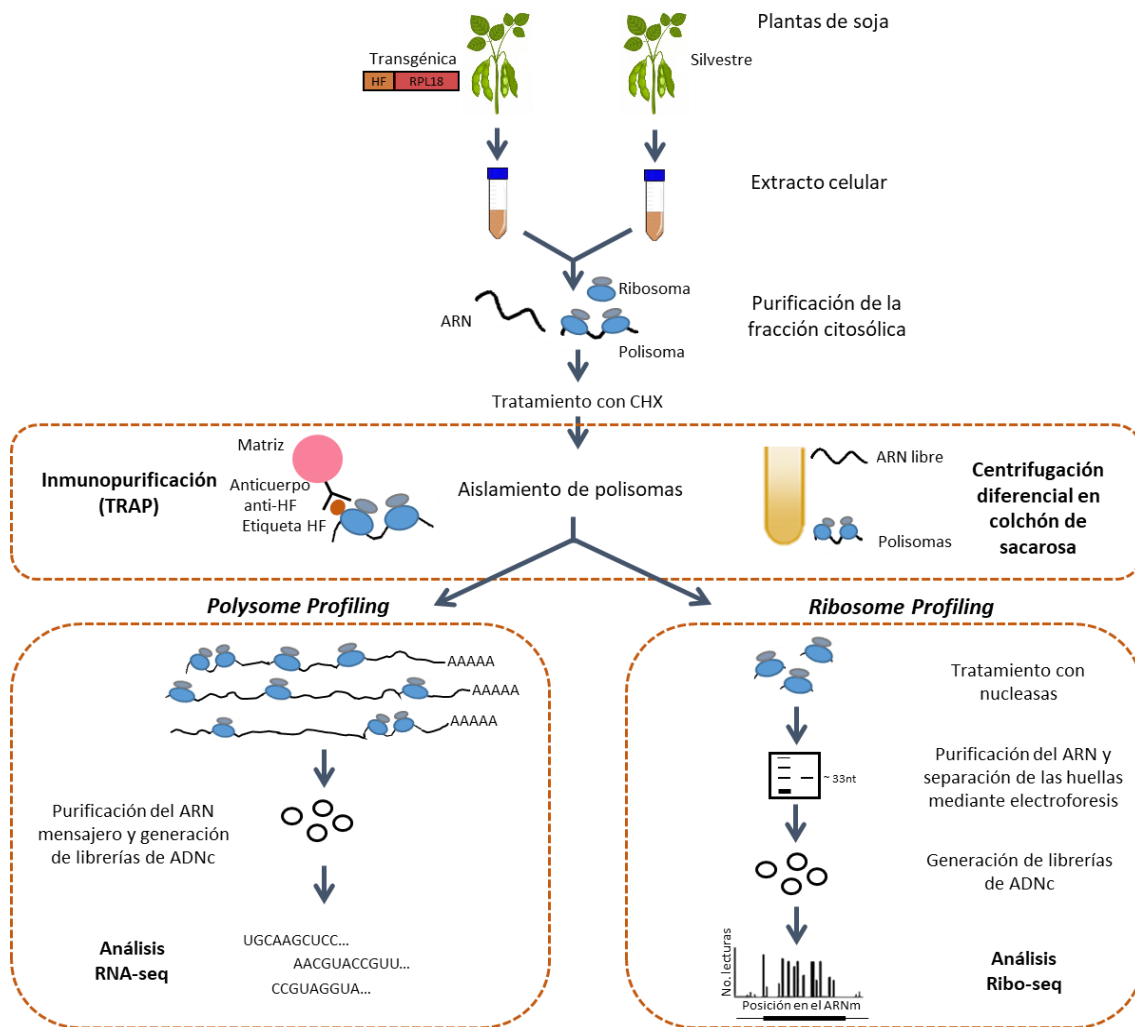


Figura 5. Esquema de las estrategias para el análisis de ARN mensajeros traduccionalmente activos a partir de la extracción de polisomas. A partir de plantas de soja, silvestres o transgénicas expresando la proteína ribosomal L18 (RPL18) con la etiqueta HF según la metodología a seguir, se realiza la lisis celular del tejido con el que se desea trabajar, en condiciones libres de ARNasas (para mantener la integridad del ARN) y se purifica la fracción citosólica. En este paso se debe aplicar el antibiótico cicloheximida (CHX) para inmovilizar los ribosomas en el ARN mensajero (ARNm). Para la obtención de los polisomas, se puede emplear la metodología TRAP (*Translational Ribosome Affinity Purification*), para lo cual es necesario contar con plantas transgénicas que expresen ribosomas etiquetados que permitan su purificación por afinidad (HF-RPL18), o pueden ser obtenidos mediante ultracentrifugación en colchones de sacarosa. La elección de una u otra metodología radica principalmente en el equipamiento de laboratorio y los materiales (principalmente de las plantas transgénicas) con los que se cuenta. Una vez obtenidos los polisomas, se puede seguir la estrategia de *Polysome profiling* o *Ribosome profiling*, dependiendo de la información que se quiera obtener. Para el *Polysome Profiling*, se purifica el ARNm de los polisomas y se generan librerías de ADN copia (ADNc) que luego se secuencian de forma masiva y se realiza el análisis computacional (análisis RNA-Seq). De esta forma se pueden identificar los ARNm que se encontraban asociados a polisomas, es decir, que estaban siendo activamente traducidos, al momento de la cosecha de las plantas. Para el *Ribosome Profiling*, la fracción polisómica se trata con nucleasas con la finalidad de degradar las secuencias del ARNm no protegidas por los ribosomas unidos al mismo, y se purifican y separan los fragmentos restantes del ARNm (huellas) de aproximadamente 33 nucleótidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. A partir de estos fragmentos se generan librerías de ADNc que luego se secuencian de forma masiva y se realiza el análisis computacional (análisis Ribo-Seq). Esta estrategia, además de identificar los ARNm activos traduccionalmente, brinda información muy precisa relacionada al posicionamiento de los distintos ribosomas sobre cada ARNm individual permitiendo, por ejemplo, la identificación de nuevos transcritos codificantes o isoformas proteicas.

(Mustroph et al., 2009). Es por esto que monitoriar la asociación de mRNAs a los ribosomas permite evaluar el estado traduccional de dichos mRNAs.

Luego de separar la fracción polisomal del ARN libre, ya sea mediante colchón de sacarosa o mediante metodologías de inmunopurificación de los polisomas, se pueden emplear distintas metodologías para analizarlos si bien la más utilizada en la actualidad es el RNA-Seq. Para ello, se purifica el ARNm de la fracción polisomal, se generan las librerías de ADN copia (ADNc) y posteriormente se realiza la secuenciación masiva. Estas metodologías se basan en que debido a que la tasa de iniciación generalmente limita la traducción, la mayoría de las respuestas traduccionales alterará la densidad de los ribosomas en un ARNm dado y son empleadas, por tanto, para identificar genes que están siendo traducidos activamente (a diferencia de la información transcripcional que se obtiene mediante metodologías de secuenciado del ARNm total). Paralelamente, los cambios en los niveles de ARN total suelen medirse para estudiar la relación entre el dcaimiento de la transcripción y traducción en diferentes condiciones y para discriminar entre genes sujetos a control transcripcional y traduccional (King and Gerber, 2016).

El *Polysome Profiling* (Polysome-Seq) es una metodología que puede ser aplicada tanto para el análisis de un ARNm en particular (Chassé et al., 2016), así como para análisis más genéricos (Larsson et al., 2013). Se basa en la inmovilización de los ribosomas en los mRNAs por tratamiento con cicloheximida (CHX) seguido por la purificación de los ARNm de la fracción polisomal y generación de librerías de ADNc para la secuenciación masiva. Permite conocer el nivel de expresión de genes que están siendo traducidos en un momento celular específico según la densidad de los *reads* obtenidos. Una gran ventaja de esta metodología es la de acceder a la longitud completa de los ARNm traducidos, incluidas las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) brindando información muy valiosa debido a que estas regiones albergan elementos que actúan en *cis* regulando la traducción (Gebauer et al., 2012). La identificación de las UTR es esencial para un análisis integral de la regulación de la expresión génica. Además, el *Polysome Profiling* se puede combinar con *western blot* y/o proteómica para monitorear proteínas asociadas con ribosomas y/o complejos de iniciación (Chassé et al., 2017). Un estudio que ha demostrado la utilidad del *Polysome Profiling* es el realizado por Arribere et al., 2011 donde analizaron la inhibición generalizada de la traducción en respuesta al estrés celular en levaduras, un procedimiento que parece implicar el movimiento del ARNm de complejos polisómicos a cuerpos P. Se cree que el movimiento de transcriptos a cuerpos P es un fenómeno genérico en las células eucariotas (Arribere et al., 2011). Si bien teóricamente la eficiencia de la purificación de los polisomas depende en el número de ribosomas asociados (ya sea mediante TRAP o

mediante gradientes o colchones de sacarosa), reflejando la actividad traduccional de cada ARNm, en *Polysome Profiling* se desconoce el número exacto de ribosomas por ARNm.

Cuando un ribosoma está sintetizando una proteína, el mismo abarca una región de aproximadamente 33 nt del ARNm molde sobre el cual está “apoyado” y lo protege de la digestión por nucleasas. La metodología de *Ribosome Profiling* (Ribo-Seq) consiste en la inmovilización de los ribosomas en los mRNAs por tratamiento con CHX seguido por la digestión del ARNm con nucleasas que degradan las secuencias no protegidas por el ribosoma, la cual fue descrita por primera vez por Ingolia y Weissman, entre otros colaboradores en el año 2009 (Ingolia et al., 2009). Los fragmentos protegidos (huellas) son secuenciados mediante tecnologías de última generación, de manera de identificar la posición que ocupaban los ribosomas sobre cada ARNm individual.

En la descripción de Ingolia y Weissman, el primer paso consiste en la lisis celular bajo condiciones que eviten la separación de los ribosomas y la degradación del ARNm. Luego el sobrenadante es digerido por nucleasas para generar las huellas ribosomales. Los ribosomas son recuperados por ultracentrifugación y las huellas ribosomales son luego purificadas y ligadas mediante un *linker* para luego llevar a cabo la transcripción reversa a ADNc. Los ADNc generados son circularizados para generar librerías de secuenciación.

Este análisis se basa en la aproximación de que la densidad de ribosomas unidos a un ARNm se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente, asumiendo de esta manera que las tasas de elongación son constantes. Alineando las secuencias obtenidas de las huellas ribosomales (fracciones protegidas por el ribosoma), frente a la base de datos de ARNm correspondiente y calculando los niveles de expresión a partir del conteo de secuencias alineadas, se pueden conocer los niveles estimados de la traducción de cada ARNm. La abundancia de huellas en los reportes de secuenciación da información del nivel de expresión de cada gen. Además, revela la región exacta del transcriptoma que está siendo traducida (Ingolia et al., 2012). Esta metodología ha permitido obtener información de las posiciones de los ribosomas a lo largo de los ARNm. Sin embargo, esta metodología tiene varios puntos a tener en cuenta como por ejemplo que requiere días de trabajo y por lo tanto no es aplicable para análisis masivos (King and Gerber, 2016; Mazzoni-Putman and Stepanova, 2018).

Por otro lado, el *Ribosome Profiling* además de ser una herramienta óptima para la medición de la síntesis de proteínas a nivel de todo el genoma, también es capaz de descubrir nuevos

mecanismos reguladores de la traducción. Si bien se espera que las huellas ribosomales mapeen en regiones codificantes, el estudio realizado por Ingolia, et al., en levaduras reportó que una pequeña fracción de huellas (1.2%) mapean en regiones no codificantes (Ingolia et al., 2009). Sumado a esto, dado que las huellas ribosomales tienen una precisión que permite observar la periodicidad de a tres bases nucleotídicas, dicha información permite identificar las distintas posiciones de los ORFs (*open reading frame*), codones de iniciación no canónicos, y codones *stop* (Ingolia, 2016; Ingolia et al., 2009).

Cabe mencionar que, en ambas metodologías, *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling*, es necesario el secuenciado del ARNm total presente en la célula o tejido para normalizar los resultados de secuenciación y poder obtener información cuantitativa. Además, ambas metodologías poseen la desventaja de que requieren una gran cantidad de material de partida para obtener ARN suficiente para la secuenciación, siendo esto un punto crítico principalmente en el caso de *Ribosome Profiling* por trabajar con fragmentos ADNc de pequeño tamaño.

A modo de resumen, se describen en la **Tabla 1** las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos antes mencionados, tanto para la obtención de la fracción polisomal como para las metodologías de *profiling* para el estudio del traductoma.

2.4.1 Aislamiento de la fracción polisomal

El aislamiento o purificación de los ARNm asociados a ribosomas puede llevarse a cabo mediante gradientes de densidad, como los gradientes y colchones de sacarosa, o mediante inmunoprecipitación ya sea utilizando un anticuerpo contra una proteína de los complejos ribonucleoproteicos o a partir de ribosomas etiquetados mediante la adición de un pequeño epítipo (etiqueta) al extremo de una de sus proteínas, que permite la purificación por afinidad del complejo sin afectar el ensamblado y la función de los ribosomas o la formación de polisomas (Bailey-Serres, 2013). En ambas metodologías es imprescindible la inmovilización de los polisomas mediante tratamiento con CHX, antibiótico que difunde rápidamente en las células deteniendo los ribosomas en las etapas de iniciación y elongación de la traducción (Obrig et al., 1971).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de dos metodologías para el análisis del traductoma - *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling* - y para el aislamiento de la fracción polisomal - ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y *Translating ribosome affinity purification* (TRAP) [Adaptada de King and Gerber, 2016].

	Metodologías	Ventajas	Desventajas
Análisis del traductoma	<i>Polysome Profiling</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de la densidad de ribosomas • Fraccionamiento según la ocupación de los ribosomas en el ARNm 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación con pseudo-polisomas
	<i>Ribosome Profiling</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de la densidad de ribosomas • Información sobre la posición de los ribosomas • Descubrimiento de nuevos ORFs, codones de inicio alternativos, isoformas de proteínas, sitios de pausa en la traducción, dinámica traduccional. 	<ul style="list-style-type: none"> • Caro (por pequeño tamaño de los fragmentos) • Método largo para trabajar con muchas muestras a la vez • Contaminación con pseudo-polisomas • Análisis bioinformático intenso debido al pequeño tamaño de los fragmentos
Aislamiento de la fracción polisomal	Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	<ul style="list-style-type: none"> • Método tradicional utilizado para distintos tejidos • No requiere modificación genética 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor cantidad inicial de células • Equipamiento especializado (ultracentrífuga) • Falta de especificidad de tipo celular
	<i>Translating ribosome affinity purification</i> (TRAP)	<ul style="list-style-type: none"> • Menor cantidad inicial de células • Tejido/célula específico • Simple, económico y robusto 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere modificación génica

Aislamiento de polisomas mediante gradientes de sacarosa

El método tradicional utilizado para la purificación y separación de complejos de ARNm-ribosomas de diferente tamaño es la ultracentrifugación diferencial en gradientes de sacarosa. Este método permite la separación de los distintos componentes de forma que los polisomas de gran tamaño (ARNm unidos a muchos ribosomas), los monosomas (80S), las subunidades ribosomales (40S y 60S) y el ARNm libre pueden separarse en base a sus coeficientes de sedimentación (Fleischer et al., 2006; Mašek et al., 2011).

La ultracentrifugación en gradientes (o colchones) de sacarosa requiere de equipamiento especializado como lo es la ultracentrífuga que no todos los laboratorios poseen. El procedimiento es laborioso y no permite la manipulación de varias muestras a la vez (King and Gerber, 2016). A su vez, esta metodología tiene la desventaja de que las fracciones polisomales obtenidas pueden estar contaminadas con otros complejos de ribonucleoproteínas de alto peso molecular, es decir con alto coeficiente de sedimentación, tales como pseudo-polisomas, cuerpos de procesamiento y gránulos de almacenamiento entre otros mRNPs (Fleischer et al., 2006; Halbeisen and Gerber, 2009) que co-sedimentan con los polisomas durante la ultracentrifugación (Thermann and Hentze, 2007). Sin embargo, una gran ventaja de este método es que no requiere la manipulación génica del tejido con el que se desea trabajar (**Tabla 1**)

Esta metodología para el aislamiento de polisomas fue introducida hace más de 50 años (Warner et al., 1962) y ha sido aplicada para estudiar el estado traduccional de los ARNm de células sometidas a distintas condiciones y en distintas especies como levaduras (Ashe et al., 2000; Dickson and Brown, 1998; Uesono and Toh-e, 2002), bacterias (Irwin et al., 1973; Xia et al., 2001), plantas (Breen et al., 1972; Davies et al., 1972; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002) y células mamíferas (Tscherne and Pestka, 1975; Wei et al., 1995). Es de destacar que dicha metodología también permite el seguimiento de las proteínas asociadas a complejos de iniciación o ribosomas mediante proteómica como en el estudio de Fleisher, et al. en levaduras (Fleischer et al., 2006). A su vez, tiene una variedad de alternativas para aplicar con el fin de extender el análisis como ser *western blot*, *northern blot*, análisis de ARNm individuales como qRT-PCR o análisis de genoma completo mediante microarreglos (Mašek et al., 2011) y más recientemente mediante secuenciación masiva (Karginov and Hannon, 2013; Spangenberg et al., 2013). El análisis global del perfil de ARNm en las distintas fracciones del gradiente, permite

obtener la densidad de los ribosomas en cada ARNm individual, es decir, si es un ARNm que esta unido a uno (monosomas) o varios ribosomas (polisomas) (Arava et al., 2003).

Aislamiento de polisomas mediante TRAP

Más recientemente, se desarrolló la metodología TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*) que se basa en la inmunoprecipitación de ribosomas, y los ARNm asociados a ellos, utilizando una etiqueta que se fusiona a una proteína ribosomal. Una consideración importante en este sentido es que la proteína ribosomal etiquetada presente el extremo fusionado a la etiqueta en una región expuesta en la superficie del ribosoma para que el complejo pueda ser purificado por afinidad.

Los autores que desarrollaron esta técnica en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), Zanetti et al., luego de etiquetar distintas proteínas tanto de la subunidad menor como mayor del ribosoma, determinaron que el etiquetado de la proteína ribosomal L18 (RPL18) en su extremo N-terminal permitía inmunoprecipitar de manera satisfactoria los polisomas (Zanetti et al., 2005). Esta proteína compone la subunidad ribosomal 60S y su extremo N-terminal se localiza en la periferia del ribosoma, lo que asegura la exposición de la etiqueta HF. La selección de esta etiqueta denominada HF (ver sección 4.3 para su descripción) se basó en la predicción de que un pequeño epítopo de alrededor de 2KDa no afectaría el ensamblado ni la función de los ribosomas. Estos mismos estudios se realizaron en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*, donde también se demostró que el etiquetado de RPL18 permitía la purificación de los polisomas (Reynoso et al., 2013). Otra consideración relevante respecto a la metodología es que es recomendable, para asegurar un correcto ensamblado y funcionamiento de los ribosomas, el uso de subunidades nativas al organismo en el que se va a desarrollar la metodología de TRAP.

Esta metodología ha sido aplicada en otros organismos tales como en células de carcinoma humano (Tenenbaum et al., 2000), en células musculares de *Caenorhabditis elegans* en el primer estadio larvario (Roy et al., 2002) y en levaduras (Baßler et al., 2001; Harnpicharnchai et al., 2001).

La metodología de TRAP cuenta con la ventaja de que puede ser adaptada para tejidos o células específicas. El traductoma de una célula o tejido particular puede ser aislado si se expresan ribosomas etiquetados guiados por promotores específicos para un tipo celular o tejido de

interés (Heiman et al., 2014; Jiao and Meyerowitz, 2010; Mustroph et al., 2009). El desarrollo de esta aplicación ha facilitado la purificación y análisis de los ARNm asociados a ribosomas, y a diferencia del método convencional de purificación de polisomas, la metodología de TRAP no requiere de equipamiento especializado. Sin embargo, se precisa generar material transgénico para la purificación de los ribosomas etiquetados, este paso puede llegar a ser un determinante a la hora de escoger la metodología ya que debe ser un material celular que permita la modificación génica (**Tabla 1**).

Una comprensión integral de los mecanismos de respuesta de las plantas al estrés es importante para dilucidar los factores clave que afectan el rendimiento del cultivo de soja en condiciones adversas, en este caso, frente al déficit hídrico. Es por esto que en el presente trabajo se propuso el uso de metodologías basadas en *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling* para analizar el traductoma y evidenciar cuales genes están traduccionalmente activos en raíces de plantas de soja sometidas a déficit hídrico.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Contribuir a la mejora de la tolerancia al déficit hídrico en soja mediante la generación de conocimiento acerca de los mecanismos de respuesta a este estrés. El análisis e identificación de los cambios asociados a la maquinaria traduccional de la raíz en respuesta al déficit hídrico, permitirá definir posibles genes candidatos que estén involucrados en los mecanismos de tolerancia.

3.2 Objetivos específicos

- I. Desarrollar en soja una metodología adecuada para el aislamiento de polisomas.
- II. Realizar un análisis RNA-Seq a partir de los ARNm purificados a partir de la fracción polisómica, así como los purificados a partir de la fracción citosólica (ARN total).
- III. Identificar los genes que están siendo traducidos de forma diferencial en raíces de plantas de soja noduladas y sometidas a déficit hídrico.

4 Materiales y métodos

4.1 Reactivos químicos y bioquímicos

La procedencia de la mayoría de los reactivos bioquímicos fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). Las soluciones nutritivas se prepararon con agua destilada, mientras que para los ensayos bioquímicos y de biología molecular se utilizó agua ultra pura estéril (Easypure™ LF, Barnstead, EEUU). Las referencias de los reactivos de bioquímica y biología molecular empleados figuran en el texto entre paréntesis junto a cada producto.

4.2 Material biológico

4.2.1 Plantas

Las semillas de soja de los genotipos Don Mario 6.8i (DM), Génesis 5601 (GE) y *Thorne* fueron cedidos por Sergio Ceretta (INIA La Estanzuela). Los dos primeros genotipos (DM y GE) fueron caracterizados en nuestro laboratorio como de respuesta contrastante al déficit hídrico, siendo DM de respuesta lenta y GE de respuesta rápida. DM presenta un grupo de madurez (GM) 6 largo, mientras que GE posee GM 5.6. Ambos genotipos son de ciclo medio y con hábito de crecimiento indeterminado.

La esterilización superficial de estas semillas se realizó mediante el método del gas cloro que consistió en colocar las semillas en un contenedor abierto dentro de un desecador junto con un matraz con 100 mL de hipoclorito de sodio comercial al que se le agregó, justo antes de cerrar el desecador, 3 mL de ácido clorhídrico concentrado. Una vez cerrado el desecador, se dejó que el gas cloro esterilizara las semillas durante 4h. Transcurrido este tiempo, el desecador se abrió en una campana de gases y se cerró el contenedor de las semillas.

Para los ensayos de transformación de plántulas de soja, la germinación de las semillas se realizó en bandejas de 31x15x10 cm utilizando como sustrato una mezcla arena-vermiculita (1:1) estéril. Las bandejas se colocaron en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de 800 μmol de fotones·m⁻²·seg⁻¹, con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a una temperatura que oscilaba entre 30/20 °C (día/noche). Luego de la infección de las plántulas con *Agrobacterium*

rhizogenes (*A. rhizogenes*) (sección 4.4.3.), éstas fueron transferidas individualmente a vasos de telgopor de 355 mL de volumen que contenían el mismo sustrato que las bandejas antes mencionadas y vueltas a colocar en la cámara de crecimiento asegurándonos en este caso, que la temperatura no superara los 28 °C. Previo al inicio del ensayo de déficit hídrico, las plantas fueron transferidas a los contenedores que se mencionan a continuación para los ensayos con plantas no transformadas.

Para los ensayos con plantas no transformadas, la germinación de las semillas se realizó directamente en los contenedores donde luego se realizó el ensayo de déficit hídrico. Estos contenedores o dispositivos consistieron en botellas de plástico de 500 cm³ cubiertas completamente con nylon negro, que permiten el crecimiento y desarrollo de la soja hasta la etapa V3-V4 sin afectar su desarrollo normal (Esteban Casaretto, comunicación personal). Se sembraron 3 semillas por botella (previando algún problema de germinación) y a los 5 d se seleccionó la plántula más saludable descartándose las otras dos.

Las plantas se regaron cada 2 d alternando entre la solución nutritiva B&D (Broughton and Dilworth, 1971; **Tabla 2**) y agua. Como se trabajó tanto con plantas inoculadas con rizobios para su nodulación como con plantas no inoculadas, la solución nutritiva B&D se complementó con 0.5 mM KNO₃ (concentración de nitrato permisiva de la nodulación) en el primer caso y con 5 mM KNO₃ en el caso de las plantas no inoculadas.

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva B&D.

Nutriente	Concentración (mg/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.05
KH ₂ PO ₄	68.05
Fe-Citrato	6.63
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61.65
K ₂ SO ₄	43.50
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.17
H ₃ BO ₃	0.12
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.14
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.03
Na ₂ MoO ₄	0.03

El pH se ajustó a 6.5-6.7 con KOH 2 M.

4.2.2 Microorganismos

Rizobios

Las plantas de soja se inocularon con la cepa de rizobio U1302 de *Bradyrhizobium elkanii* (*B. elkanii*). Las bacterias se crecieron en medio líquido preparado a base de manitol y extracto de levadura (YEM; Vincent, 1970; **Tabla 3**) a 125 rpm durante 2 d a 28 °C. Las plantas no transformadas se inocularon con el rizobio el mismo día que se sembraron las semillas en las botellas usándose 5 mL de inóculo por botella. Las plantas transformadas se inocularon con 5 mL del inóculo el día en que se cortó la raíz principal (ver sección **4.4.3**).

Tabla 3. Composición del medio líquido YEM para el crecimiento de rizobios.

Nutriente	Concentración (g/L)
Manitol	10
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.4

El pH se ajustó a 6.5-6.7 con KOH 2 M.

Escherichia coli

Las células de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (TOP10, DB3.1) se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB; **Tabla 4**) a 250 rpm durante 16 h a 37 °C. En el caso de las células transformadas, se añadió el antibiótico de selección correspondiente (mencionado en cada caso). La selección de células transformadas se realizó en placas Petri con medio LB sólido con el correspondiente antibiótico. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h.

Tabla 4. Composición del medio líquido LB para crecimiento de *E. coli*.

Nutriente	Concentración (g/L)
Tiptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5

Agrobacterium rhizogenes

La cepa de *A. rhizogenes* utilizada para la transformación de las plántulas de soja fue la cepa hipervirulenta K599 (NCPB2659), la cual contiene el plásmido RI 2659 de tipo cucumopina y resistencia a espectinomicina 30 µg/µL (Sm/SpR). La cepa fue proporcionada por el Dr. Germán Robert del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba, Argentina. En una etapa inicial de este trabajo, se utilizó una cepa de *A. rhizogenes* proporcionada por la Dra. Ma. Eugenia Zanetti de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

4.3 Clonado de la proteína de fusión HF-RPL18 mediante el sistema *Gateway*

Para aislar los polisomas de raíces de soja mediante la metodología TRAP, es necesario generar plantas transgénicas que expresen en sus raíces la RPL18 fusionada a una etiqueta que permita la purificación por afinidad de los complejos ribosomas-ARNm. En este caso, se usó la etiqueta denominada HF (epítipo dual conformado por la etiqueta 6xHis, un espaciador (3 glicinas) y la etiqueta FLAG), basándonos en referencias bibliográficas (Castro-Guerrero et al., 2016; Zanetti et al., 2005), generando así el fragmento HF-RPL18. Para ello, se generó una construcción que contiene el fragmento de fusión HF-RPL18 en el vector de destino pk7GWIWG2D(II),0 (**Figura 6**). Este vector presenta dos marcadores de selección: Sm/SpR para la selección en bacterias (100 µg/µL en *A. rhizogenes* y 50 µg/µL en *E. coli*) y el gen de resistencia a kanamicina (*Km*) para la selección en el tejido vegetal y, además, contiene como gen reportero al gen de proteína verde fluorescente (eGFP). La fusión del fragmento HF y el ORF del gen RPL18 de soja fue generado previamente en el laboratorio y para realizar su clonado en el vector pk7GWIWG2D(II),0 se utilizó la tecnología *Gateway* (LR clonasa). El tamaño esperado de la RPL18 es de 21 kDa y la etiqueta HF es de 3 kDa.

La tecnología de clonado *Gateway* consistió principalmente en tres pasos:

i) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de amplificar el fragmento a clonar en el denominado “vector de entrada”. Para ello se diseñaron cebadores *Fwd* HF-RPL18 y *Rev* RPL18 (Tabla 5). En el caso del cebador *Fwd*, se agregó al extremo 5’ una secuencia de 4 bases (CACC) necesaria para el clonado direccional (Tabla 5). El programa que se utilizó para la PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 55°C y 1 min a 72 °C, con una etapa final de elongación de 5 min a 72 °C y se realizó en un termociclador PCYL220 Issue 1 (Thermo). El producto resultante de las reacciones de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X (40 mM Tris base pH 8.0; 40 mM ácido acético; 1 mM ácido etilendiaminotetraacético-EDTA).

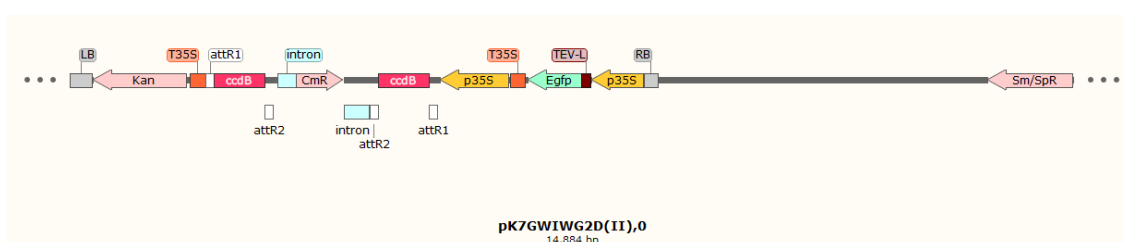


Figura 6. Esquema del vector pK7GWIWG2D(II),0. Se indican las regiones comprendidas en el T-DNA y el gen de resistencia a espectinomicina para la selección en bacteria (Sm/SpR). La imagen fue extraída del Software SnapGene.

Tabla 5. Lista de cebadores utilizados.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' → 3')
RPL18 <i>Fwd</i>	CACCATGGGACATCACCATCATCACC
RPL18 <i>Rev</i>	TCAAACCTCTAAAGCCTCTGCTATT
HF-RPL18 <i>Fwd</i>	CACCATGGGAATCGATTTGAAGG
Acuaporina <i>Fwd</i>	CAGTCGACAGCAAAAAGAAAGAATCCCAGGC
Acuaporina <i>Rev</i>	CCGAATTCGATTAAGCATGAACCGTTTGATTG
3' <i>ocs</i>	CATGCGATCATAGGCGTCTCG

ii) Clonado de dicho fragmento en el vector pENTR/D-TOPO entre las secuencias *attL1* y *attL2*. En la tecnología *Gateway*, el fragmento de interés es clonado en dicho vector para generar el vector de entrada a partir del cual se pueden realizar clonados de un solo paso en los vectores destinos que se deseen. Para esta reacción se agregó: 4.8 ng del fragmento de ADN, 10.5-14 ng del vector pENTR/D-TOPO, 1 µL de la solución salina, 2.3 µL de agua ultra pura estéril y se incubó 5 min a temperatura ambiente (RT) y a continuación se transformaron células competentes TOP10 comerciales. Para la transformación de las células se agregó 1 µL de la reacción de

clonado a 200 μL de células competentes apenas descongeladas, se mezcló con *tip* y se colocaron en hielo durante 30 min. Luego se realizó un *shock* térmico de 30 seg a 42 °C e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 min. Se agregó 250 μL de medio SOC [20 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 3.6 g/L glucosa; 0.186 g/L KCl; 0.5 g/L NaCl; 0.96 g/L MgCl_2] y se incubaron horizontalmente a 37 °C durante 30 min. Luego, se plaquearon en placas con medio LB-agar con la adición de *km* 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se confirmaron las colonias positivas mediante *colony* PCR utilizando los mismos cebadores y el mismo programa que para la PCR del paso *i*, y se analizaron los productos mediante gel de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X. A partir de las colonias positivas se realizaron minipreparaciones del ADN plasmídico usando un *kit* comercial (PureLink, ThermoFisher Scientific). Éstas fueron analizadas por digestión con enzimas de restricción (RsaI y ApaI/XbaI (Fermentas)) para confirmar la presencia del inserto y el patrón de digestión fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X.

iii) Reacción de recombinación, mediada por la enzima LR clonasa, que permite transferir el fragmento de interés desde el vector de entrada hacia el vector de destino. Nuestro vector de destino, el pk7GWIWG2D(II),0, contiene las secuencias *attR1* y *attR2* para permitir la recombinación entre las secuencias *attL1* y *attL2* del vector de entrada. Para ello se siguieron los pasos sugeridos por el fabricante que se describen a continuación: se mezcló 1 μL del vector de entrada (81 ng; pENTR/D-TOPO/HF-RPL18), 1 μL del vector destino pk7GWIWG2D(II),0 (125 ng) y 6 μL de *buffer* TE pH 8.0 [10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA] y se incubó en hielo durante 2 min. Luego, se agregaron 2 μL del mix de la enzima LR clonasa (*Gatway LR clonase II enzyme mix*, Invitrogen-Thermo Fisher, Cat # 11791-019), y se aplicó vórtex brevemente. A continuación, se realizó un *spin* y se incubó la reacción a 25 °C durante 2 h. Para finalizar la reacción, se agregó 1 μL de proteinasa K (provista por el *kit*) para inactivar la enzima LR clonasa, y se incubó a 37 °C durante 10 min. Se transformaron células competentes TOP10 comerciales con 1 μL de la reacción siguiendo los mismos pasos que se describieron en el punto *ii*. Se plaquearon las bacterias en placas de LB-agar con espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se las dejó crecer a 37 °C durante 16 h. Al siguiente día se confirmaron las colonias positivas mediante *colony* PCR (como se describe en el punto *ii*). Finalmente se enviaron a secuenciar cuatro de los plásmidos potencialmente recombinantes y el pENTR/D-TOPO/HF-RPL18 (vector de entrada) con el que se trabajó.

4.4 Transformación de plántulas de soja mediada por *A. rhizogenes*

4.4.1 Transformación de *A. rhizogenes*

Para comenzar con el protocolo de transformación de las plántulas, es necesario contar previamente con la cepa hipervirulenta K599 de *A. rhizogenes* transformada con las construcciones de interés. En este caso, se transformaron células competentes de K599 con la construcción generada, llamada de aquí en adelante pk7-GFP/HF-RPL18, y una construcción brindada amablemente por el Dr. David Mendoza Cozatl de la Universidad de Missouri, USA, que también contenía el gen *RPL18* de soja fusionada a la etiqueta HF, llamada USA-GFP/HF-RPL18 (**Tabla 6**). Esta construcción fue solicitada cuando comenzamos a tener dificultades en la obtención de *hairy-roots* transgénicas como se menciona más adelante (sección 5.2.2).

Tabla 6. Construcciones con las que se transformó la cepa hipervirulenta K599 de *A. rhizogenes*.

Nombre de la construcción	Inserto	Gen reportero	Resistencia	Referencia
Pk7-GFP/HF-RPL18	HF-RPL18	Egfp	Espectinomicina 100 µg/µL	Este trabajo
USA-GFP/HF-RPL18	HF-RPL18	gfp	Kanamicina 50 µg/µL	Castro-Guerrero et al., 2016

La transformación de las células K599 se realizó mediante electroporación utilizando un electroporador modular (The Gene Pulser Xcell™, Biorad). Se comenzó descongelando alícuotas de 80 µL de células competentes en hielo y se agregó aproximadamente 200 ng del plásmido a cada una. Las muestras se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,1 cm las cuales se colocaron en el equipo y se utilizó el protocolo para *Agrobacterium* (pulso de C = 25 µF; PC = 200 ohm; V = 2.4 kV). Inmediatamente después se agregó 200 µL de medio SOC y se dejó 1 h en estufa a 28 °C para la recuperación de las células. Luego, se plaquearon en medio LB-agar con el antibiótico correspondiente (**Tabla 6**) y se incubaron a 28 °C durante 2 d. Para identificar las colonias positivas se realizó *colony* PCR de las mismas de la siguiente manera: *i*) se picó parte de la colonia y se inoculó 1 mL de LB con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer a 28 °C con agitación durante 16 h. *ii*) se centrifugó el cultivo a 5000 *xg* durante 20 min y se congeló el *pellet* a -20°C durante 30 min. *iii*) se resuspendió el *pellet* congelado en 100 µL de agua ultra pura estéril y se lisaron las células sometiéndolas a 100 °C durante 5 min. La PCR se realizó como se describe en la sección 4.3 utilizando 5 µL del lisado celular como molde de ADN. Una vez confirmadas las colonias positivas, se hicieron cultivos en medio líquido con los antibióticos

correspondientes (**Tabla 6**) que se dejaron crecer durante 2 días a 28 °C para preparar gliceroles (concentración final 12.5%) que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Un punto importante a remarcar aquí, que resultó evidente durante el transcurso de este trabajo, es que *A. rhizogenes* pierde muy rápidamente virulencia cuando se descongelan/congelan los gliceroles, por tanto, es muy importante hacer varias alícuotas de dichos gliceroles de forma de usar cada uno una única vez.

4.4.2 Crecimiento de *A. rhizogenes* recombinante

Para realizar la infección de las plántulas de soja para su transformación, es importante crecer el cultivo de manera tal de asegurarnos que mantenga la virulencia y sea capaz de infectar. Para ello, se comenzó realizando una estría a partir de una alícuota almacenada a -80 °C en placa de LB con los antibióticos correspondientes y se dejó crecer durante 2 d a 28 °C. Luego se repicó una colonia de la placa crecida en una nueva placa, pero esta vez con 200 µM de acetosiringona (para estimular la virulencia) además de los antibióticos, y se dejó creciendo toda la noche en las mismas condiciones. Al día siguiente, a partir de esta colonia se inocularon 200 mL de LB líquido y se dejó creciendo toda la noche a 28 °C con agitación (125 rpm). El día de la infección de las plántulas, se centrifugó el cultivo a 5000 xg durante 10 min con el fin de obtener un *pellet* pastoso que fue utilizado para infectar las mismas.

4.4.3 Infección de plántulas de soja con *A. rhizogenes* para obtener *hairy-roots* transgénicas

Al tercer día de sembradas las semillas de soja (sección **4.2.1**), se inició el crecimiento de la cepa K599 de *A. rhizogenes* transformada con las construcciones de interés (sección **4.4.2**). La infección se realizó en plántulas de 7 d que se encontraban en condiciones óptimas para la transformación (con cotiledones verdes y sin separar) siguiendo el protocolo de Kereszt, et al. (Kereszt et al., 2007) con algunas modificaciones según se indica a continuación: a cada plántula se le realizó un pequeño corte (1 cm de largo y 0.3 cm de profundidad, aproximadamente) en el hipocótilo superior justo por debajo de los cotiledones con un bisturí, luego se colocó sobre dicha herida la pasta obtenida en la centrifugación del cultivo de *A. rhizogenes* y se pinchó la herida con la aguja de una jeringa de 1 mL con el fin de permitir el ingreso de la bacteria. Luego, las plántulas se colocaron en vasos de telgopor (ver sección **4.2.1**) teniendo la precaución de que la herida quedara bien cubierta con el sustrato húmedo. Es muy importante para la transferencia e integración del T-DNA y el desarrollo de las *hairy-roots* que exista una alta

humedad en la herida y que la temperatura oscile entre 25/28 °C, dado que a temperaturas superiores la maquinaria de transferencia del T-DNA se ve afectada, disminuyendo drásticamente la transformación (Kereszt et al., 2007). Los vasos se colocaron en la cámara de crecimiento con las condiciones antes mencionadas (sección 4.2.1). Se dejó que las plantas generaran las *hairy-roots* durante al menos 10 d hasta que las mismas estuvieran lo suficientemente grandes (al menos 2 cm de largo) para sostener el desarrollo de la planta y entonces se cortó la raíz principal para evitar que compita con las *hairy roots* en desarrollo. A continuación, las plantas se colocaron en los contenedores tipo botellas de plástico y fueron llevadas a la cámara de crecimiento para que desarrollaran aún más las *hairy-roots* para luego iniciar el ensayo de déficit hídrico (sección 4.5). En la etapa de puesta a punto de esta metodología, la confirmación de la presencia de raíces transgénicas se realizó en principio mediante un microscopio de epifluorescencia (ZEISS-AXIO Imager M2) usando filtros de excitación entre 450-490 nm y emisión a 515 nm debido a la presencia del gen reportero *Egfp* en las construcciones. También se observaron las raíces en el microscopio láser confocal espectral invertido Leica (DMI6000, TCS SP5) equipado con el software LASAF v2.0 ubicado en Plataforma de Microscopía, Institut Pasteur de Montevideo.

Además de la observación al microscopio, se utilizaron técnicas moleculares para confirmar la presencia de material transgénico como se describe a continuación.

4.4.4 Confirmación de la obtención de raíces y nódulos transgénicos mediante técnicas moleculares

La confirmación de la presencia de la fusión HF-RPL18 en *hairy-roots* y nódulos se realizó mediante PCR a partir de ADN genómico utilizando los cebadores para amplificar el transgen (sección 4.3), y la expresión de la proteína RPL18 fusionada a la etiqueta HF mediante análisis *western blot* empleando dos anticuerpos que reconocen distintas regiones de dicha etiqueta (la región FLAG y la región 6xHis). También se intentó comprobar la presencia de la proteína GFP en el material vegetal.

Con el fin de disminuir la contaminación con el *A. rhizogenes* libre que pudo quedar en el sustrato y por tanto adherido a raíces y nódulos, al momento de cosechar las raíces éstas se lavaron con Tween 20 al 0,05%. Se realizó un lavado con agua estéril, luego se dejaron en agua-Tween 20 durante 5 min y por último se enjuagaron con agua. Luego de realizados estos lavados,

se congeló el material vegetal rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ADN genómico y PCR

Para la extracción de ADN genómico a partir de *hairy-roots* y nódulos de plantas de soja se comenzó por macerar 100 mg de tejido con nitrógeno líquido en microtubos con la ayuda de micro manos de mortero. Luego, se agregó a cada tubo 700 µL de *buffer* de extracción [2% (p/v) CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 7.5-8.0; 1% 2-mercaptoetanol], se mezcló por inversión 3 veces y se incubó a 65 °C durante 30 min realizando vortex ocasionalmente. Una vez que las muestras se enfriaron, se agregó 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 (v/v)), se invirtieron los tubos 6 veces y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a RT. Como resultado de esta centrifugación se obtuvieron 2 fases; la acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó el mismo volumen de isopropanol. Se invirtió 2 veces y se incubó a -20 °C durante 90 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó 2 veces con 1 mL de etanol 70% cada vez. Finalmente, el *pellet* se dejó secar a 37 °C y se resuspendió en agua ultra pura estéril. Las reacciones de PCR empleando como molde el ADN genómico se realizaron según lo indicado previamente en la sección **4.3**.

Extracción del ARN total y retrotranscripción a ADNc (RT)

En algunos casos se realizó la extracción del ARN total de raíces y nódulos con el fin de realizar PCR sobre el ADNc obtenido de la retrotranscripción (RT-PCR). Para la extracción del ARN se utilizó el kit comercial Bioline (Cat # BIO-52040) y para la retrotranscripción a ADNc se utilizó el kit comercial SuperScrip IV (Thermo Fisher Scientific, Cat # 18090010) y se siguieron las instrucciones del fabricante en ambos casos. En las reacciones de PCR, para amplificar el ADNc del transgen se siguió el protocolo descrito en la **sección 4.3**. También se realizaron PCR para amplificar el gen de la Acuaporina de la familia MIP (Glyma14g06680) como control de un gen endógeno de soja, utilizando los cebadores indicados en la **Tabla 5** con el siguiente programa de PCR: etapa inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 58°C y 1 min a 72 °C, con una etapa final de elongación de 5 min a 72 °C, en termociclador PCYL220 Issue 1 (Thermo).

Análisis de western blot

Este análisis requiere, en primer lugar, la obtención de extractos de proteína total. Para preparar estos extractos a partir de raíces y nódulos de soja, se comenzó por macerar el tejido en microtubos con la ayuda de micro manos de mortero, en el caso de las raíces fue necesario hacerlo en nitrógeno líquido. Luego, se agregó *buffer* de extracción [100 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 7.2; 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS); 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); cocktail inhibidor de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free Sigma-Aldrich); 0,05% 2-mercaptoetanol] a cada tubo manteniendo una relación tejido:*buffer* 1:5. Luego de homogeneizar, se realizaron 2 centrifugaciones a 12000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C con la finalidad de obtener un sobrenadante limpio. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) empleando seroalbúmina bovina como estándar.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Para la preparación del gel y del buffer de corrida se siguió el protocolo propuesto por Laemmli (Laemmli, 1970). La concentración de poliacrilamida utilizada para los geles concentrador y separador fue 5% y 12%, respectivamente. El buffer de corrida utilizado fue 25 mM Tris pH 8.3, 0.19 M glicina y 0,1% SDS. Los extractos proteicos obtenidos se mezclaron con tampón de carga [0.192 M Tris-HCl pH 6.8; 0.002% (p/v) Azul de bromofenol; 2% (p/v) SDS; 5% (v/v) β -mercaptoetanol; 10% (v/v) glicerol] y se calentaron durante 10 min a 90 °C. Se cargaron 10 μg de proteína por pocillo. La electroforesis se realizó en una cuba Bio-Rad® (MiniProtean® III), la cual se inició a 80 V hasta que las muestras ingresaran en el gel separador y luego se continuó a 100 V hasta el final de la corrida.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron durante 10 min en *buffer* de transferencia [25 mM Tris-HCl; 192 mM glicina pH 8.3; 20% metanol] al igual que las membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno (Sigma-Aldrich)), cortadas 0,5 cm más grande que el gel, y las hojas de papel Whatman 1, cortadas del mismo tamaño que las esponjas y rejillas del dispositivo de electrotransferencia, que se montó según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad®). La electrotransferencia se realizó a 31 mA durante 60 min. Las membranas se tiñeron en una solución 0.5% (p/v) de rojo ponceau (Sigma-Aldrich) y 1 % (v/v) ácido acético para comprobar la correcta transferencia de las proteínas. El bloqueo de las membranas se realizó mediante incubación en buffer Tris salino [TBS; 50 mM Tris-HCl pH 7.6; 150 mM NaCl] con 5% (p/v) de leche en polvo descremada durante 1 h a 4 °C y en agitación a 80 rpm. Luego, se

realizaron 3 lavados con TBS con 0,2 % Tween (TBS-T) de 10 min cada uno y con agitación a 80 rpm.

Para la inmunodetección de HF-RPL18 se utilizó en primer lugar un anticuerpo primario monoclonal fabricado en ratón que reconoce la región FLAG de la etiqueta HF (anti-HF) y que está conjugado a peroxidasa (HRP) (Abcam, Cat # 49763; dilución 1:500). Otro anticuerpo usado para este mismo fin fue el anticuerpo primario monoclonal fabricado en ratón anti-His-probe (H-3) (Santa Cruz Biotechnology, Cat # sc-8036; dilución 1:500) que reconoce la región 6xHis de la etiqueta HF y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Thermo Fisher Scientific, Cat # G-21040; dilución 1:10000). Para la inmunodetección de GFP (cuyo gen está presente en los vectores empleados) se utilizó un anticuerpo primario policlonal fabricado en conejo anti-GFP (Sigma-Aldrich, Cat # G-1544; dilución 1:2000) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Agrisera, Cat # AS09602; dilución 1:15000). En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en TBS-T con 5% de leche en polvo descremada.

La incubación de las membranas con cada uno de los anticuerpos se realizó durante 60 min a RT en agitación a 30 rpm. Luego de cada una de estas incubaciones, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min cada vez. La detección de la actividad de la peroxidasa se realizó por quimioluminiscencia empleando el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad®, Cat # 170-5061) o el kit Super Signal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Cat # 34095) según las indicaciones de los fabricantes y según el requerimiento. Por último, luego de 1 min de incubación con los reactivos de los kits de revelado, se removió el líquido sobrante de las membranas y éstas se visualizaron en el *scanner* C-Digit® (LI-COR).

4.5 Ensayo de déficit hídrico en plantas de soja

Los ensayos de déficit hídrico se realizaron, inicialmente, en plantas presuntamente transformadas con la construcción pk7-GFP/HF-RPL18 (sección 4.4.3) con la finalidad de purificar los polisomas por afinidad mediante la metodología TRAP y en plantas sin transformar para purificar los polisomas mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. En ambos casos, los genotipos de soja usados fueron DM y GE que, como se mencionó previamente, presentan una respuesta contrastante al déficit hídrico siendo DM de respuesta lenta y GE de respuesta rápida. Además, en el caso de los ensayos con plantas transformadas, se trabajó

también con el genotipo Thorne que es el genotipo de referencia para la técnica de transformación mediada por *A. rhizogenes*.

Las plantas se crecieron en cámara de crecimiento con condiciones controladas como se describió anteriormente, en botellas de plástico de 500 cm³ que permitieron el crecimiento y desarrollo de la soja hasta los estadios fenológicos V3-V4 sin afectar su desarrollo normal. Como ya fue también mencionado, en el caso de las plantas transformadas, estas fueron transferidas a botellas una vez que desarrollaron las *hairy roots* y se les cortó la raíz principal. Cada botella contenía una única planta. El diseño del experimento fue completamente al azar con 5 repeticiones (botellas) por tratamiento siendo la unidad experimental 1 botella con 1 planta. En el caso de las plantas sin transformar, se realizaron 2 ensayos independientes; en el caso de las plantas transformadas, al resultar evidente que no se iba a poder continuar con esa estrategia, únicamente se realizó un ensayo de déficit hídrico. Las plantas noduladas (N) se inocularon con la cepa U1302 de *B. elkanii* el día de la siembra de las semillas en el caso de las plantas sin transformar y en el día de corte de la raíz principal en el caso de las plantas transformadas. Ya había sido comprobado en el laboratorio que los dos genotipos con los que se trabajó resultan nodulados de forma exitosa con esta cepa. A los 19 días de la siembra de las semillas (plantas en estadio fenológico V2), las plantas N y no-noduladas (NN) correspondientes al tratamiento “déficit hídrico” se dejaron de regar hasta el fin del ensayo, y se mantuvo el riego a capacidad de campo (contenido de agua que es capaz de retener el suelo luego de su saturación) a las plantas N y NN correspondientes al tratamiento “sin restricción hídrica”.

La metodología de fenotipado que se utilizó para monitorear el establecimiento de la condición de estrés por déficit hídrico fue la conductancia estomática. Asimismo, se realizó una curva de retención de agua del sustrato (arena:vermiculita 1:1) para monitorear el suministro de agua a la planta. La conductancia estomática se midió diariamente en la cara abaxial de cada folíolo de la tercera hoja trifoliada luego de 6 h de encendida la luz de la cámara de crecimiento en todas las plantas utilizando un porómetro SC-1 (Decagon Device, Inc). El punto final de la condición de estrés se consideró cuando cada planta alcanzó un valor de conductancia estomática en el entorno del 50% del valor registrado al inicio del ensayo (día 19). En este punto también se determinó el porcentaje de humedad del sustrato en cada unidad experimental. Una vez alcanzado dicho valor de conductancia estomática, cada planta fue cosechada y sus raíces (plantas NN) o raíces y nódulos por separado (plantas N) se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Al finalizar el ensayo se obtuvo 8 grupos de plantas (con 5 repeticiones cada uno) según el número de genotipos y tratamientos:

genotipo (DM y GE), nodulación (plantas N y NN) y condición hídrica (“sin restricción hídrica” y “déficit hídrico”).

4.6 Metodologías para el aislamiento de polisomas

4.6.1 Aislamiento de polisomas de raíces de soja mediante la metodología TRAP

Esta metodología se llevó cabo a partir de las plantas del genotipo Thorne transformadas (obtenidas según lo indicado en la sección 4.4.3) ya que la expresión de la proteína de fusión HF-RPL18 en las raíces permite el aislamiento por afinidad de los polisomas (**Figura 7**). En primer lugar, se estimó un volumen de 15 mL de raíces previamente pulverizadas con nitrógeno líquido. Luego se colocó el tejido pulverizado en mortero previamente esterilizado y enfriado y se agregaron dos volúmenes del *buffer* de extracción de polisomas (PEB, ver **Tabla 7**). En el caso de los nódulos, se partió de menor cantidad, aproximadamente 1 g, al que directamente se le agregó el *Buffer* PEB respetando la relación de dos volúmenes. El extracto celular se transfirió a un tubo falcon de 50 mL y se dejó en agitación durante 30 min en hielo. Luego, se centrifugó 15 min a 16000 xg a 4°C. El sobrenadante (SN-16) se filtró utilizando lana de vidrio estéril compactada hasta la marca de 1 mL en una jeringa de 10 mL y se transfirió a un nuevo tubo. Se reservó una alícuota del SN-16 para realizar la extracción de ARN total y para electroforesis de proteínas. Se resuspendió la resina de agarosa conjugada al anticuerpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F2426) en *buffer* de lavado (WB, **Tabla 8**), del cual se utilizó 1 mL para 300 μ L de resina y se incubó 5 min en agitación. Se centrifugó 2 min a 500 xg y luego se reemplazó el sobrenadante por WB. Este lavado se repitió tres veces. A continuación, se agregó la resina equilibrada al SN-16 y se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación. Posteriormente se recuperó la resina mediante centrifugación a 500 xg a 4°C. En algunos casos se conservó una fracción de este sobrenadante (material no unido: UBF) con el fin de analizarlo posteriormente. Se resuspendió la resina en WB y se mantuvo en agitación durante 5 min a 4 °C y se repitió la centrifugación. Dicho procedimiento se realizó hasta un total de 6 lavados, descartando el último sobrenadante. A la resina empaquetada se le agregó *buffer* de elución (300 μ L partiendo de 15 mL de tejido pulverizado) que contiene 200 ng/ μ L del péptido 3X FLAG (Sigma-Aldrich, F4799) diluido en WB, y se transfirió la suspensión a un tubo de 1.5 mL y se incubó durante 30 min a RT. Dicho péptido compete por los sitios de unión de los anticuerpos de la resina, provocando la elución de los ribosomas etiquetados. Para recuperar el sobrenadante, el cual debería de contener los polisomas, se centrifugó durante 5 min a 18000 xg . A la muestra

obtenida se la denominó “TRAP” y fue posteriormente utilizada para la extracción de ARN con TRIzol, como se especifica a continuación, y para realizar electroforesis de proteínas (ver sección 4.4.4).

Tabla 7. Composición del *Buffer* de extracción de Polisomas (PEB).

PEB
200 mM Tris-HCl pH 9
200 mM KCl
25 mM EGTA pH 8,0
35 mM MgCl ₂
1% mix de detergentes: Brij-35 20% (p/v), Triton X-100 20% (v/v), Igepal CA 630 20% (v/v) y Tween 20 20% (v/v)
1% PTE (<i>polyoxyethylene 10 trydecyl ether</i>)
1 mM DTT (ditiotretitol)
1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
50 µg/ml CHX

Tabla 8. Composición del *Buffer* de lavado (WB).

WB
200 mM Tris-HCl pH 9
200 mM KCl
25 mM EGTA pH 8,0
35 mM MgCl ₂
1 mM DTT (ditiotretitol)
50 µg/ml CHX

Extracción de ARN con TRIzol

Para la extracción de ARN de las muestras de TRAP (ARN asociado a polisomas) y SN-16 (ARN total) con TRIzol se siguieron las instrucciones del fabricante. Se comenzó agregando 800 µL de TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific, Cat # 10296028) a dichas muestras. Se aplicó vortex durante

30 seg y se incubó 5 min a RT para permitir la disociación de los complejos ribonucleoproteicos. A continuación, se agregó 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión durante 15 seg y se incubó a RT durante 3 min. Luego, se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se repitió la extracción con cloroformo para evitar la contaminación con TRizol. Para precipitar el ARN, se agregaron 500 µL de isopropanol y 2 µL de glucógeno (Thermo Fisher Scientific, Cat # R0551; *carrier* que se utiliza para ayudar a la precipitación del ARN), se invirtió el tubo con cuidado y se incubó 30 min a -80°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se secó en *SpeedVac* (Thermo Fisher Scientific) durante aproximadamente 10 min a RT. Una vez seco, se resuspendió en agua miliQ estéril y se incubó a 60 °C durante 10 min para lograr una resuspensión completa. El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso. Para estimar la concentración y la integridad del ARN se utilizó el Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific (Ref. Q33226) y se corrió un gel de agarosa 1,2% en *buffer* TAE tendiendo las precauciones necesarias para evitar la contaminación con ARNasas.

4.6.2 Aislamiento de polisomas de raíces de soja mediante centrifugación diferencial en colchón de sacarosa

Para esta metodología partimos de plantas de soja silvestres ya que no se requiere ninguna modificación genética previa, como en el caso de TRAP (**Figura 7**). Para la preparación de los extractos celulares a partir de los cuales se aislaron los polisomas mediante esta metodología, se siguió el mismo protocolo utilizado para el método TRAP hasta la obtención del sobrenadante SN-16 descrito en la sección **4.6.1**. Sin embargo, en este caso el filtrado se realizó a través de cuatro capas de gasa estéril y se realizaron dos centrifugaciones a 16000 xg durante 15 min a 4°C, con el fin de obtener el sobrenadante lo más limpio posible (SN-16). En este paso se reservó una alícuota del sobrenadante para la obtención de ARN total (a la cual denominamos “ARN total”). Para preparar el colchón de sacarosa, que consistió en dos capas, se partió de un stock 2M de sacarosa y se prepararon dos concentraciones: 12% y 33,5% con el agregado de la Solución de Sales (**Tabla 9**) al 10%, 50 µg/ml CHX y completado el volumen necesario con agua destilada. Luego, se cargó 2 mL del SN-16 en un colchón de sacarosa de dos capas (en tubos de policarbonato para ultracentrífuga mantenidos en hielo) preparado de la siguiente forma: 4,5 mL de la solución de 33,5% de sacarosa (capa inferior) y 4,5 mL de la solución de 12% de sacarosa (capa superior) y se realizó una corrida en ultracentrífuga (Beckman L-100K clase S; IIBCE) utilizando el rotor SW40 Ti a 35.000 rpm durante 165 min a 4 °C. Una vez finalizada la corrida,

se colectaron los tubos, se removió el colchón de sacarosa con mucho cuidado, se lavaron las paredes del tubo con agua estéril, evitando tocar el pellet, y el *pellet* se resuspendió en 200 μ L de *buffer* de resuspensión de polisomas (RB, **Tabla 10**). En todo momento se trabajó en frío y manipulando con mucha precaución para evitar la contaminación con ARNasas. Se dejó en hielo por 30 min y se transfirió la muestra a un tubo eppendorf, se centrifugó brevemente a 4°C y se transfirió a un tubo nuevo. En este paso se puede medir la OD260 de la muestra para estimar la concentración de ARN y por tanto el rendimiento.

Tabla 9. Composición de Solución de Sales 10X.

Solución de Sales 10X
400 mM Tris-HCl pH 8.4
200 mM KCl
100 mM MgCl ₂

Tabla 10. Composición del *Buffer* de Resuspención de Polisomas (RB).

RB
200 mM Tris-HCl pH 9
200 mM KCl
25 mM EGTA
35 mM MgCl ₂
5 mM DTT (ditiotretitol)
50 μ g/ml CHX

Para la puesta a punto del método de aislamiento de polisomas de raíces de soja mediante centrifugación diferencial en colchón de sacarosa, fue necesario visualizar la presencia de polisomas en la resuspensión final del *pellet* y la presencia de los monosomas en la interfase entre las dos capas (12 y 33.5%) del colchón. Para ello, se realizó una centrifugación diferencial en gradiente de densidad de sacarosa. Los gradientes se prepararon en tubos de policarbonato a partir de soluciones de sacarosa al 15% y 50% preparadas de la misma manera que las soluciones de sacarosa descritas anteriormente. Se utilizó una bomba peristáltica que impulsa las soluciones de sacarosa desde un soporte de acrílico (que permite la mezcla gradual de ambas soluciones) hacia los tubos de policarbonato. Una vez que los gradientes estuvieron fríos, uno

de ellos se cargó con 600 μL de la resuspensión final del *pellet* y otro con 150 μL de la interfase y se realizó una corrida en ultracentrífuga (Beckman L-100K clase S; IIBCE) utilizando el rotor SW40 Ti a 35.000 rpm durante 165 min a 4 °C. Una vez finalizada la corrida, los gradientes se analizaron con un lector de absorbancia a 254 nm (Cole-Parmer, #EW -42664-35) conectado a un ordenador y a una bomba peristáltica que impulsa las soluciones de los gradientes hacia el lector de forma de lograr una medición continua de los gradientes. Una vez que el método estaba optimizado para el aislamiento de polisomas de raíces de soja, es decir que confirmamos que la concentración de sacarosa utilizada en los colchones nos permitía aislar los polisomas sin tener contaminación de monosomas, se procedió con el protocolo de *Ribosome profiling*.

A modo de resumen de lo mencionado en esta sección **4.6**, en la **Figura 7** se muestra la consecución de pasos realizados para la obtención del material vegetal de trabajo según la estrategia elegida para el aislamiento de polisomas.

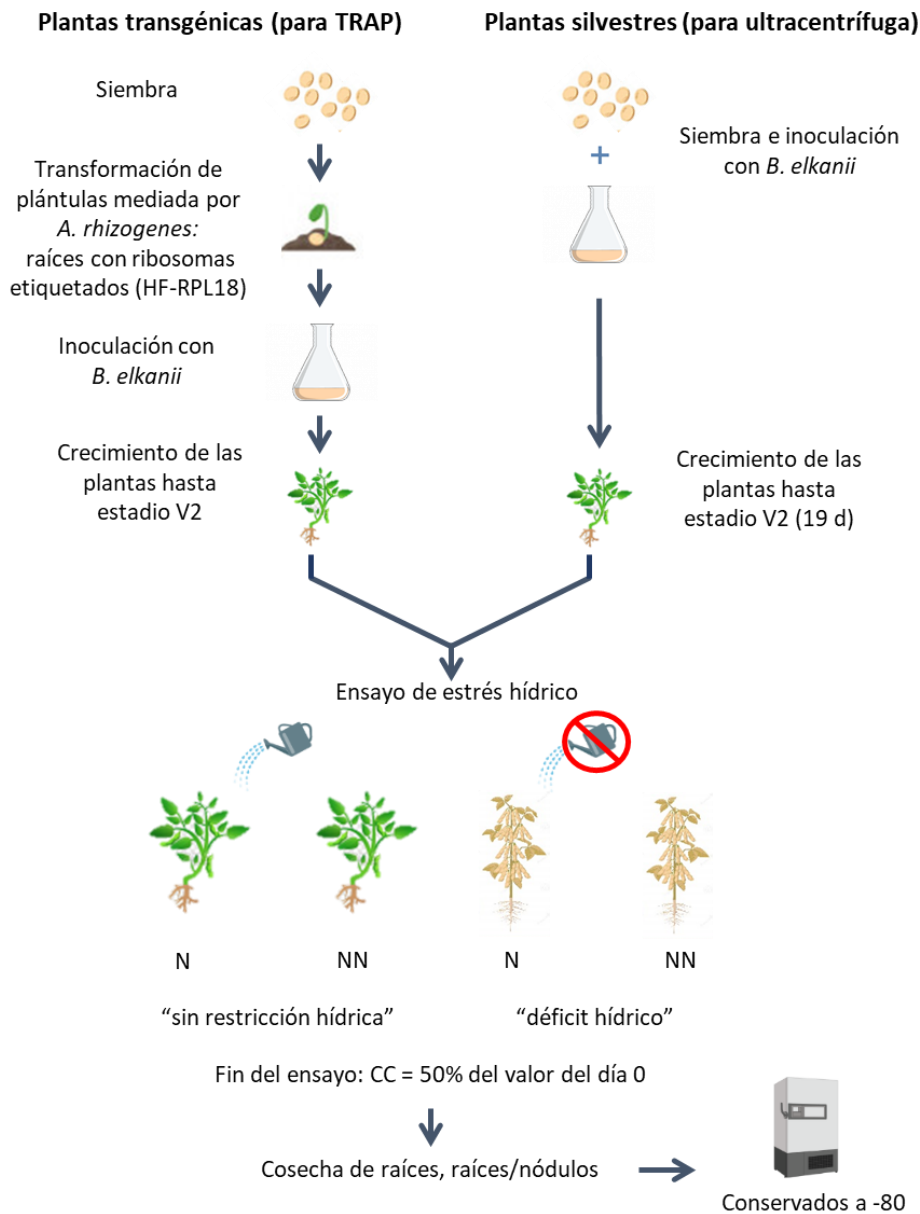


Figura 7. Esquema de la metodología seguida para la obtención de plantas de soja transgénicas y del crecimiento de plantas de soja silvestres para la realización de los ensayos de déficit hídrico. En el caso de la metodología para obtener plantas transgénicas (ribosomas etiquetados) que permitan inmunopurificar los polisomas (TRAP), 7 días después de sembradas las semillas se infectan las plántulas generando una herida en la región proximal del hipocótilo donde se coloca la cepa K599 de *A. rhizogenes* transformada con la construcción de interés. Una vez obtenido un número de *hairy-roots* suficiente para soportar el crecimiento de las plantas, se corta la raíz principal y, aquellas plantas correspondientes al tratamiento “noduladas” (N), se inoculan con *B. elkanii*. En el caso del crecimiento de plantas silvestres para purificar los polisomas mediante centrifugación diferencial en colchón de sacarosa, la siembra de las semillas y la inoculación con *B. elkanii* se realiza el mismo día, y las plantas se crecen hasta el estadio V2. En este punto, se inicia el ensayo de estrés por déficit hídrico en el cual plantas N y “no noduladas” (NN) correspondientes al tratamiento “déficit hídrico” se dejan de regar, manteniendo el riego a las plantas N y NN correspondientes al tratamiento “sin restricción hídrica”. El punto final de la condición de estrés se establece para cada planta cuando ésta alcance un valor de conductancia estomática (CC) del 50% del valor registrado al inicio del ensayo. Las raíces y las raíces y nódulos de plantas NN y N, respectivamente, se cosechan, se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C. Por cada genotipo ensayado, se obtienen grupos de plantas pertenecientes a 4 condiciones experimentales: plantas N sin restricción hídrica, plantas NN sin restricción hídrica, plantas N con déficit hídrico, plantas NN con déficit hídrico.

4.7 Obtención de huellas ribosomales para realizar *Ribosome Profiling*

Una vez aislados los polisomas, se procedió a la purificación de las huellas ribosomales, es decir, los fragmentos del ARNm protegidos por los ribosomas. Esta actividad fue realizada en el IIBCE y se siguió el protocolo puesto a punto por investigadores del Departamento de Genómica para células neuronales (Eastman, 2016).

Para obtener las huellas ribosomales, luego de aislados los polisomas se realizó la digestión con ARNasas, en este caso se utilizó la endonucleasa Benzonasa (Sigma-Aldrich, Cat # E1014). Se agregaron 94 U de la enzima a 200 μ L de la resuspensión de polisomas y se incubó durante 10 min a RT. La digestión se detuvo con el agregado del *buffer* de lisis del *kit* de purificación de micro ARN *mirVana* (Thermo Fisher Scientific, Cat # AM1560) y se continuó con el protocolo de purificación utilizando dicho *kit* y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez purificado el ARN resultante de las digestiones, el mismo se precipitó agregando 1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 en 10 volúmenes de ARN (1:10) con el agregado de 2 μ L glucógeno (Thermo Fisher Scientific, Cat # R0551). Se mezcló con cuidado y se agregó 4 volúmenes de etanol absoluto y se incubó toda la noche a -20 °C. Al siguiente día, se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min a RT. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se lavó dos veces el *pellet* con etanol 80% frío. Se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 10 min a RT. Posteriormente, se eliminaron las trazas de etanol con una punta fina de pipeta y se dejó secar el *pellet*. Finalmente, éste se resuspendió en 5,5 μ L de agua libre de ARNasas. Se midió la concentración del ARN utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

A continuación, se procedió a la purificación de los fragmentos de ARN del tamaño esperado para las huellas ribosomales (33 nt aproximadamente) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de urea 7M. La corrida electroforética se realizó a 200 V durante 60 min. Los geles se revelaron con GelRed (Olerup SSP® GelRed™ Cat # 39K) y se escanearon digitalmente con el equipo FUJIFILM FLA-9000 (equipo institucional del IIBCE). Es relevante mencionar que todo el material electroforético utilizado para ARN debe ser descontaminado de ARNasas tratándolo previamente a su uso con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 min y enjuagado posteriormente con agua miliQ tratada con DEPC (Sigma-Aldrich Cat # D5758).

Para tener referencias del tamaño de los fragmentos, se utilizó un marcador de ADN de 10 bp (Thermo Fisher Scientific, Cat # 10821015) y dos oligos de ADN de 26 y 34 nt de largo que, a pesar de que no migran igual que oligos de ARN (los oligos de ADN migran más rápido), se utilizaron como referencia al momento de cortar las bandas del gel de poliacrilamida. El corte de las bandas se realizó en un transiluminador UV y se purificó el ARN a partir del gel. Para ello, una vez cortada la banda del gel, se agregó 400 μ L de *buffer* de extracción de gel (300 mM acetato de sodio pH 5.5, 1.0 mM EDTA and 0.25% (m/v) SDS) y se dejó 30 min a -80°C , y luego en agitación circular toda la noche. Posteriormente, el líquido se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 2 μ L de *glycoblue* (Thermo Fisher Scientific, Cat #AM9516; *carrier* que cumple la misma función que el glucógeno mencionado previamente) y se precipitó el ARN mediante el agregado de 500 μ L de isopropanol incubándolo toda la noche a -80°C . Al siguiente día se siguió el mismo protocolo de lavado que para la precipitación con acetato de sodio, pero esta vez se realizaron las centrifugaciones a 4°C . Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 5,5 μ L de agua libre de ARNasas de los cuales 5 μ L se conservaron y con el resto se realizó una dilución 1:10 y se midió su concentración e integridad utilizando un Bioanalyzer (Agilent) empleando un chip para pequeños ARN.

5 Resultados y Discusión

La sequía es una de las principales limitantes para la producción de soja en todo el mundo. Como se mencionó anteriormente, el establecimiento de una relación simbiótica entre las leguminosas, como la soja, y los rizobios, permite llevar a cabo el proceso de FBN mediante el cual la planta se beneficia del NH_4^+ que le aporta la bacteria proveniente de la reducción del N_2 atmosférico. Esta relación simbiótica es muy importante para lograr una agricultura sustentable ya que permite el crecimiento de la planta en suelos deficientes en N y, por tanto, disminuye el requerimiento del uso de fertilizantes químicos. A pesar de la relevancia de lo antes mencionado, actualmente se cuenta con relativamente poca información disponible acerca de cómo la sequía afecta la relación simbiótica entre las bacterias fijadoras de N y la planta hospedera. Sin embargo, sí es conocido que la FBN es de los primeros procesos fisiológicos que resultan afectados por la sequía. Para estudiar estos procesos, muchos autores se han basado en la observación de la variación en la abundancia de ARNm en plantas sometidas a déficit hídrico para el análisis de la expresión del genoma. No obstante, estos enfoques no proporcionan información sobre la síntesis de proteínas, que en la mayoría de los casos es el producto funcional de la expresión génica. Durante muchas décadas, los cambios a nivel de la transcripción se han utilizado como medida de los cambios de la expresión de proteínas, sin embargo, como se mencionó previamente, es conocido que los cambios en el ARNm no dan una imagen precisa de lo que está sucediendo con las proteínas debido a la regulación postranscripcional de la expresión génica. Por lo tanto, no hay una dependencia entre los cambios a nivel del transcriptoma y los que ocurren a nivel del traductoma. Debido a que existen pocos estudios sobre el análisis de traductomas en leguminosas, en el presente trabajo de tesis se propuso investigar acerca de cómo se ve afectada la relación simbiótica entre la soja y su socio simbiótico, *Bradyrhizobium*, mediante el análisis del traductoma como herramienta para evaluar la regulación génica en condiciones de déficit hídrico.

Durante el transcurso de este trabajo, se presentaron distintos inconvenientes que, si bien se intentaron subsanar de distintas formas, al final, resultó necesario repensar las estrategias experimentales para poder alcanzar algunos de los objetivos iniciales. En este sentido algunos resultados que se pretendían obtener no fueron posibles de lograrse en los tiempos que se asignan a un trabajo de Maestría. De todas formas, se logró un avance en la aplicación de distintas metodologías novedosas para el laboratorio que pueden ser utilizadas y servir de punto de partida para otros estudios en distintos organismos modelos con los que también se trabaja.

A su vez, esto nos permitió adquirir experiencia en la obtención de material transgénico en soja a partir de la transformación con *A. rhizogenes* y saltar los inconvenientes que ahora conocemos que presenta esta técnica debido a que la bacteria pierde la capacidad de infección muy rápidamente generando baja eficiencia de transformación (Listur, 2020).

El objetivo de esta tesis fue identificar cambios asociados a la maquinaria traduccional de la raíz con el fin de definir genes candidatos que estén involucrados en la respuesta de tolerancia de las plantas al déficit hídrico. Para alcanzar este objetivo, se propuso generar plantas de soja transgénicas que expresaran en su sistema radicular la proteína ribosomal L18 fusionada a la etiqueta HF con el fin de purificar por afinidad los polisomas (TRAP) para luego, mediante las metodologías de *Polysome Profiling* y *Ribosome Profiling*, identificar los ARNm que se encontraran diferencialmente asociados a polisomas en plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico y nodulación (con respecto a sus respectivos controles). Sin embargo, no fue posible la generación de dichas plantas transgénicas y, por lo tanto, luego de varios intentos de optimización del protocolo considerando los distintos puntos que podrían estar fallando, se optó por cambiar de estrategia experimental para el aislamiento de los polisomas. En esta segunda etapa, se utilizó la metodología convencional para el aislamiento de los mismos que es mediante centrifugación diferencial en colchón de sacarosa.

Para comenzar a describir los resultados obtenidos, se menciona primero cómo fueron realizados los ensayos de estrés para obtener el material de partida a partir del cual purificar los polisomas. Cabe mencionar, no obstante, que en el caso de los ensayos para realizar TRAP éste no fue este el primer paso, sino que se debieron obtener las plantas transformadas (generación de *hairy-roots*) previamente a la realización del ensayo de déficit hídrico.

5.1 Ensayo de déficit hídrico en plantas de soja

Los ensayos se realizaron con dos genotipos de soja con respuestas contrastantes al déficit hídrico: el genotipo DM caracterizado por nuestro grupo como de respuesta lenta y el genotipo GE caracterizado como de respuesta rápida. La diferencia en la respuesta entre los genotipos implica que, frente a una condición de déficit hídrico, aquel de respuesta lenta no presenta a nivel metabólico y/o fisiológico cambios fenotípicos evidentes que indiquen una percepción clara del estrés en las primeras etapas de imposición del mismo; por el contrario, aquel de respuesta rápida presenta, en esa misma situación de estrés, cambios que evidencian una respuesta a esa condición de déficit hídrico. Esto determina que, frente a un período de déficit

hídrico de corta duración, el genotipo de respuesta lenta presentará ventajas frente al de respuesta rápida ya que no verá afectado su metabolismo y por tanto su rendimiento. Sin embargo, si el déficit hídrico se prolonga en el tiempo, este genotipo puede no ser capaz de ajustar su metabolismo a dicha condición de estrés y consumir más rápidamente el agua disponible. En la situación de un estrés hídrico prolongado, el genotipo que sí es capaz de responder rápidamente presenta ventajas frente al de respuesta lenta ya que al adaptarse desde el inicio a la nueva condición hídrica del suelo es capaz de restringir su consumo de agua y por tanto contará con agua disponible por más tiempo. Si bien las respuestas de estos genotipos frente al déficit hídrico han sido caracterizadas previamente en el laboratorio, esta caracterización no se realizó en condiciones de nodulación.

Los ensayos de estrés hídrico se realizaron en una cámara de crecimiento con condiciones controladas, correspondiendo el día 0 de estrés al día 19 de las plantas de soja (plantas no transformadas) contando desde el momento de la siembra (plantas en estadio fenológico V2) (**Figura 8**). En este día se midió la conductancia estomática de todas las plantas ya que este fue el parámetro que se seleccionó para monitorear el establecimiento y transcurso de la condición de estrés. El punto final del ensayo fue establecido de forma individual para cada planta cuando ésta alcanzó un valor de conductancia estomática en el entorno del 50% del valor registrado el día 0 del ensayo, ya que es conocido que las plantas pueden sentir la disponibilidad del agua alrededor de las raíces y responder enviando señales químicas a la parte aérea para provocar distintas respuestas adaptativas, incluida la disminución del crecimiento de las hojas y el cierre estomático (Liu et al., 2005).

Los 8 tratamientos (grupos) incluidos en el ensayo surgieron de combinar los dos genotipos de soja (DM y GE), la condición de inoculación o no-inoculación (que resulta en la obtención de plantas N y NN, respectivamente) y la condición hídrica (“sin restricción hídrica” y “déficit hídrico”). De esta forma, por cada genotipo se obtuvieron los tratamientos: plantas N “sin restricción hídrica”, plantas NN “sin restricción hídrica”, plantas N “déficit hídrico”, plantas NN “déficit hídrico”. Las plantas pertenecientes a los grupos N se inocularon con *B. elkanii* (**Figura 8. B y C**) el día de la siembra de las semillas. Las plantas pertenecientes a los grupos “sin restricción hídrica” se mantuvieron con riego a capacidad de campo durante todo el transcurso del ensayo. A las plantas pertenecientes a los grupos “déficit hídrico” se les suprimió el riego a partir del día 0 y hasta el final del ensayo (cosecha de la planta).



Figura 8. Germinación, inoculación y crecimiento de plantas de soja de los genotipos DM y GE para los ensayos de estrés hídrico. Se trabajó en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de $800 \mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, el fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y la temperatura que oscilaba entre 30/20 °C (día/noche). **A.** Dispositivos (botellas de 500 cm³) empleados que permiten el crecimiento de las plantas hasta los estadios fenológicos V3-V4 sin afectar su desarrollo normal. **B.** Inoculación de las plantas correspondientes a los tratamientos de plantas noduladas (plantas NN con y sin “restricción hídrica”). **C.** Cultivo de *B. elkanii* luego de 2 días de crecido. **D.** Ensayo completo compuesto por 40 dispositivos distribuidos al azar en el cual cada tratamiento cuenta con 5 repeticiones. La foto fue tomada luego de 5 días de la siembra de las semillas.

Como se mencionó previamente, el seguimiento de la condición de estrés en cada planta se realizó midiendo la conductancia estomática diariamente desde el día 0 hasta el punto final de cada una (5-7 d). A su vez, se realizó una curva de retención de agua del sustrato para monitorear el suministro de agua a la planta (**Figura 9**), en la cual se puede calcular la humedad del sustrato a lo largo del tiempo. Como se puede observar en las curvas, las plantas de ambos genotipos en

la condición de “déficit hídrico” (Figura 9. C y D) fueron perdiendo agua en el sustrato, que es lo esperado debido a la falta de riego. Estos resultados nos confirmaron que estábamos trabajando efectivamente bajo condiciones de déficit hídrico en las plantas pertenecientes a dicho tratamiento.

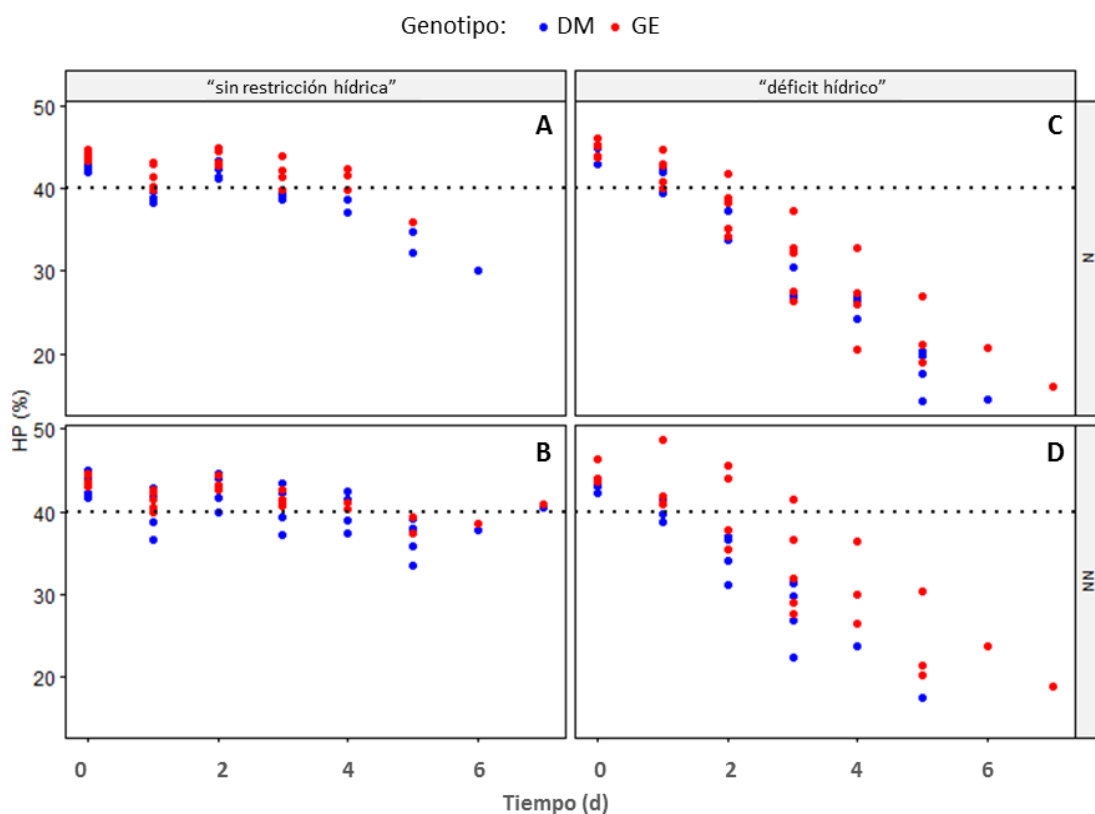


Figura 9. Curvas de retención de agua del sustrato desde que se suspendió el riego a las plantas correspondientes a los tratamientos “déficit hídrico” (día 0) hasta el punto final para cada planta (días 5-7). Ensayo realizado en plantas de soja de los genotipos DM y GE empleando como sustrato arena:vermiculita (1:1). El punto final del ensayo para cada planta fue cuando las mismas alcanzaron un valor de conductancia estomática cercano al 50% del valor obtenido el día 0. **A.** Plantas del grupo noduladas (N) “sin restricción hídrica”. **B.** Plantas del grupo no-noduladas (NN) “sin restricción hídrica”. **C.** Plantas del grupo N “déficit hídrico”. **D.** Plantas del grupo NN “déficit hídrico”. HP (%): cantidad de agua del sustrato expresada como % del peso seco de dicho sustrato. La línea punteada indica el HP (%) al cual el sustrato se encuentra en su capacidad de campo (40% en el caso del sustrato empleado en este ensayo).

5.2 Optimización de la purificación de polisomas mediante TRAP a partir de raíces de soja

5.2.1 Generación de la construcción pK7-GFP/HF-RPL18 y transformación de *A. rhizogenes*

Para llevar a cabo uno de los principales objetivos de la tesis, aislar polisomas a partir de raíces de soja, nos propusimos realizar una inmunopurificación de polisomas y para ello se requirió la generación de plantas transgénicas que expresaran en sus raíces la proteína ribosomal L18 fusionada a un epítotope dual conformado por la etiqueta 6xHis, un espaciador (3 glicinas) y la etiqueta FLAG (dicha fusión fue denominada en este trabajo HF-RPL18).

La elección de la RPL18 nativa de soja como proteína a etiquetar se debió a que está reportado en la literatura que la adición del epítotope dual a esta proteína permite la purificación por afinidad sin afectar el ensamblado y la función de los ribosomas o la formación de polisomas (Reynoso, 2013; Zanetti et al., 2005) y que el uso de la proteína nativa del organismo usado para el TRAP asegura un correcto ensamblado de los ribosomas modificados (Castro-Guerrero et al., 2016). Para comenzar con el diseño de la construcción plasmídica, se amplificó por PCR el marco abierto de lectura (ORF) de la RPL18 de soja (genotipo N7001) utilizando cebadores específicos del ORF de dicha proteína (ver **Tabla 5**) y se clonó dicho ORF en un vector conteniendo la etiqueta HF (trabajo realizado previamente en el laboratorio). Una estrategia que permite una fácil y rápida identificación de las raíces transgénicas es el uso de genes reporteros como el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), ampliamente utilizado en distintos organismos incluyendo las plantas (Chiu et al., 1996; Davis and Vierstra, 1998; Sheen et al., 1995; Xiao et al., 2010). Es por esta razón que se decidió utilizar como vector destino el pK7GWIWG2D(II),0 (**Figura 6**) el cual contiene el ORF de la eGFP (variante de la GFP). Para ello, se amplificó mediante PCR el fragmento de fusión HF-RPL18 a partir de la construcción inicial con los cebadores HF-RPL18 *Fwd* y RPL18 *Rev* y se clonó en un vector de entrada mediante la tecnología *Gateway* (denominado en este trabajo pENTR/D-TOPO/HF-RPL18). Se confirmó dicho clonado mediante digestión enzimática con *RsaI* (**Figura 10. A**) y también mediante la digestión enzimática simultánea con *Apal/XbaI* y *Apal/SgsI* (**Figura 10. B**). Los resultados de estas digestiones enzimáticas mostraron lo esperado, confirmando la correcta inserción del fragmento.

Luego, para el clonado en el vector de destino (pK7GWIWG2D(II),0), se realizó una reacción de recombinación LR entre el vector de entrada y dicho vector confirmándose la inserción mediante

PCR de colonia, digestión enzimática con la enzima *Sma*I (Figura 10. C) y posteriormente se confirmó la correcta inserción del ORF de la RPL18 y que estuviera en marco con la etiqueta HF mediante secuenciación utilizando los cebadores *Fwd* HF RPL18 y 3'ocs.

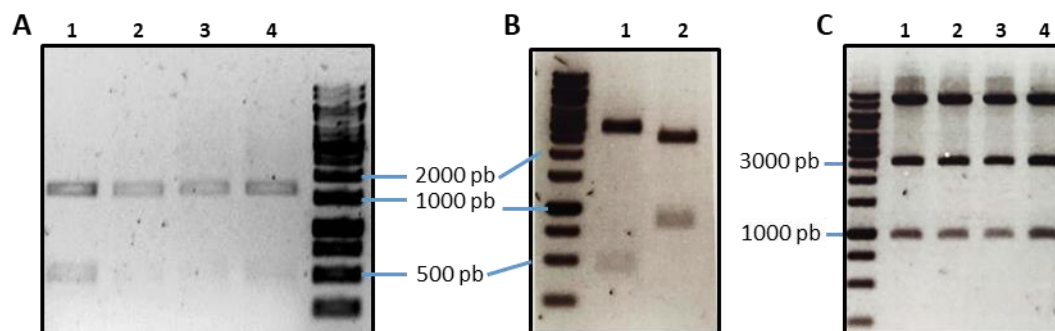


Figura 10. Confirmación de las construcciones pENTR/D-TOPO/HF-RPL18 y pK7-GFP/HF-RPL18 mediante digestión enzimática. A. Perfil de corte del vector de entrada (pENTR/D-TOPO/HF-RPL18) con la enzima de restricción *Rsa*I. Fragmentos esperados: 1580 pb y 500 pb, aproximadamente. B. Perfil de corte del vector de entrada (pENTR/D-TOPO/HF-RPL18) con las enzimas de restricción: *Apa*I/*Xba*I (1) y *Apa*I/*Sgs*I (2). Fragmentos esperados (aproximadamente): 1830 pb/392 pb y 2450 pb/772 pb, respectivamente. C. Perfil de corte del vector destino (pK7-GFP/HF-RPL18) con la enzima *Sma*I. Fragmentos esperados: 8520 pb, 2379 pb y 968 pb, aproximadamente. En A y C, los cuatro carriles (1-4) corresponden a cuatro colonias de *E. coli*. distintas producto de la transformación.

Existen diferentes métodos de transformación estable de plantas para poder estudiar y entender las respuestas génicas de las mismas. Se han obtenido plantas de soja modificadas genéticamente a partir de meristemas de brotes, nodos de cotiledones o tejidos embrionarios cultivados utilizando métodos de transformación mediados por *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) o mediante métodos de bombardeo de partículas (biolísticos) (Finer and McMullen, 1991; Hinchey et al., 1988; McCabe et al., 1988; Parrott et al., 1989; Santarém et al., 1998). Sin embargo, estas técnicas de transformación requieren largos períodos de tiempo y suelen ser poco eficientes. Frecuentemente son utilizados los sistemas de expresión génica transitoria ya que ofrecen ventajas frente a la expresión génica estable en plantas tales como permitir la acumulación de grandes cantidades de proteínas transgénicas en un breve período de tiempo y cuando se trabaja con especies recalcitrantes a la regeneración no es necesario regenerar una planta transgénica a partir de una célula transformada (Sheludko et al., 2006).

El método de transformación de plantas de soja utilizado en este trabajo se basó en el uso de *A. rhizogenes* como vector de transferencia genética (Kereszt et al., 2007). Para este tipo de abordaje se utiliza el “sistema de plantas compuestas” que fue desarrollado por Hansen et al. (Hansen et al., 1989) que consiste en la obtención de una planta con la parte aérea salvaje y con

las raíces transgénicas (Collier et al., 2005). Una de las principales ventajas de esta técnica es la capacidad de generar información a nivel de toda la planta, si se lo compara con raíces crecidas en cultivos *in vitro*, lo cual permite realizar un análisis funcional. Las plantas compuestas generadas de esta manera pueden ser trasplantadas y cultivadas en el suelo o en hidroponía. Por otro lado, al no ser necesario el cultivo de tejidos, que sí requiere la transformación estable vía *A. tumefaciens*, el método se simplifica enormemente en cuanto a costos e infraestructura requerida. Además, este sistema reduce significativamente el tiempo necesario para generar raíces genéticamente transformadas de varios meses a pocas semanas, si se lo compara con la generación de plantas transgénicas mediada por *A. tumefaciens* (Veena and Taylor, 2007).

Cuando se desea estudiar genes relacionados a la biología de la raíz como por ejemplo los que se activan durante las interacciones simbióticas y patógenas o los que cumplen un rol en la absorción de nutrientes y transporte de hormonas, es comúnmente utilizada la cepa bacteriana *A. rhizogenes* para la transferencia de ADN. Esta bacteria es el agente causante de la enfermedad de la raíz vellosa ya que provoca el desarrollo de las denominadas *hairy roots* (Chilton et al., 1982). La bacteria actúa de manera similar a *A. tumefaciens* transfiriendo su ADN-T (ADN de transferencia) endógeno del replicón extracromosómico (denominado plásmido inductor de raíz, Ri) y de cualquier vector binario al ADN genómico de la planta. La integración del ADN-T del plásmido Ri al genoma vegetal es necesario para la formación de raíces neoplásicas y plagiotrópicas, las cuales a su vez contienen ADN-T del vector binario que es co-transferido (White and Nester, 1980; Zambryski et al., 1989). Cada raíz transgénica representa un evento de transformación independiente (Kereszt et al., 2007).

Se ha reportado que la cepa K599 de *A. rhizogenes* es la más eficiente en la inducción de *hairy roots* en cotiledones de distintos genotipos de soja (Savka et al., 1990). En el presente trabajo, se utilizó dicha cepa y se le introdujo el vector binario de interés pk7-GFP/HF-RPL18 mediante electroporación. La transformación de la bacteria se confirmó mediante PCR de colonia (**Figura 11**). El mismo procedimiento fue realizado para la construcción USA-GFP/HF-RPL18 (la procedencia de esta construcción se mencionará más adelante) y para la transformación con el vector pk7GWIWG2D(II),0 (vector vacío) que se empleó como control negativo.

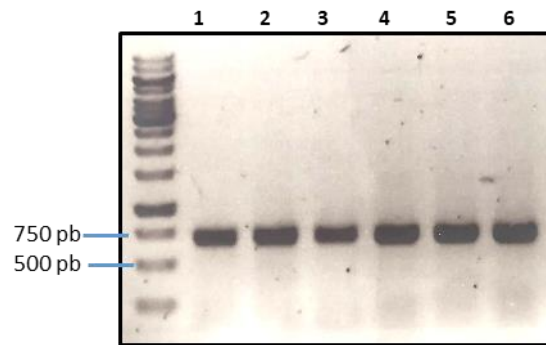


Figura 11. Confirmación de la transformación de distintas colonias de la cepa K599 de *A. rhizogenes* con la construcción pk7-GFP/HF-RPL18. Se muestra el resultado de una PCR de colonia a partir de 6 colonias diferentes (carriles 1 a 6). Se utilizaron los cebadores: HF-RPL18 *Fwd* y RPL18 *Rev*. El fragmento esperado era de 660 pb, aproximadamente.

5.2.2 Puesta a punto de la transformación de plantas de soja

La transformación de las plantas de soja se realizó en plantas de 7 días que se encontraban en condiciones óptimas para la transformación (cotiledones verdes y sin separar) mediante la infección con *A. rhizogenes*. Se siguió el protocolo publicado por Kereszt et al. (Kereszt et al., 2007), con las modificaciones que se describen en la sección 4.4.3. Primero se realizó un corte longitudinal en el hipocótilo superior (justo por debajo de los cotiledones) y luego se colocó sobre dicha herida la pasta obtenida en la centrifugación del cultivo de *A. rhizogenes* punzando en la zona del corte con la aguja de una jeringa (Figura 12). Se trabajó con plantas de los genotipos DM y GE, y con la cepa K599 de *A. rhizogenes* conteniendo la construcción pk7-GFP/HF-RPL18 o el vector vacío (pK7GWIWG2D(II),0).

En primer lugar, se trabajó con plantas de los genotipos antes mencionados. Sin embargo, debido a que se presentaron diversas dificultades para la extracción del ADN genómico y a que no se logró confirmar la presencia del transgen en las *hairy-roots*, se decidió poner a punto la técnica en el genotipo Thorne, que es el modelo para la técnica pero que no presenta ningún interés agronómico. En este caso, se realizó el mismo procedimiento para la transformación que para los genotipos DM y GE con las construcciones Pk7-GFP/HF-RPL18 o con el vector vacío y esta vez sí se logró confirmar la presencia de *hairy-roots* transgénicas mediante PCR a partir de ADN genómico y mediante RT-PCR de dichas raíces, es decir, PCR del ADNc obtenido de la retrotranscripción del ARN total extraído de las *hairy roots*. Como se puede observar en la Figura 13, los resultados obtenidos indican la presencia del transgen, ya que el fragmento obtenido empleando los cebadores HF-RPL18 *Fwd* y RPL18 *Rev* es del tamaño esperado (660 pb aproximadamente) correspondiente al transgen.

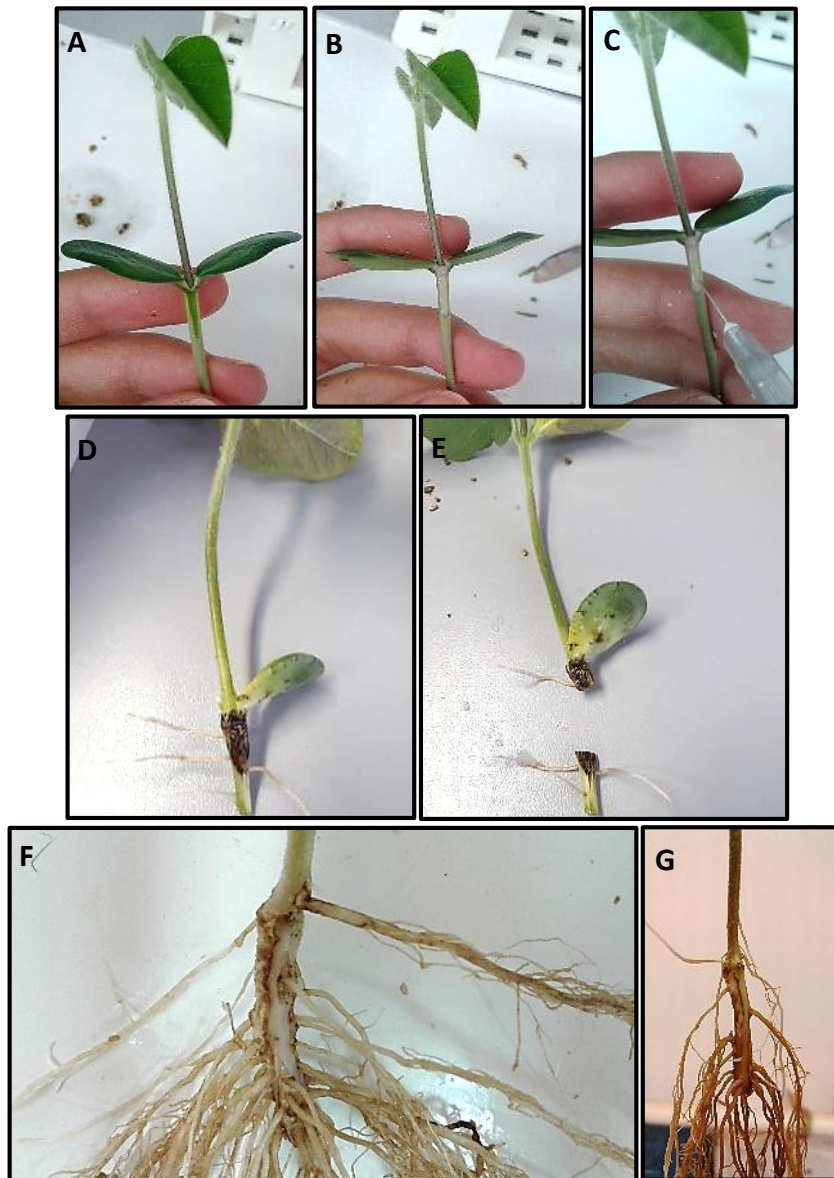


Figura 12. Infección de plantas de soja mediante *Agrobacterium rhizogenes*. A plantas de soja de 7 días se les realizó un corte longitudinal en el hipocótilo superior (justo por debajo de los cotiledones) (A), luego se colocó sobre la herida la pasta bacteriana correspondiente a la cepa K599 de *A. rhizogenes* conteniendo la construcción de interés (B), y se le realizaron a continuación, varias punciones con la aguja de una jeringa para favorecer la introducción de la bacteria (C). Aproximadamente 10 días después, a las plantas que desarrollaron *hairy roots* se les cortó la raíz principal con el fin de favorecer el crecimiento de las primeras (D-E). Al cabo de 10-15 días se observa la multiplicación y crecimiento de las *hairy roots* (F-G).

Como se puede observar en esta figura, los resultados mostraron un perfil esperable ya que no en todas las raíces analizadas se logra amplificar el transgen, sugiriendo que no todas las *hairy roots* contenían el inserto HF-RPL18 que es lo que sucedería si la eficiencia de la transformación fuese del 100%.

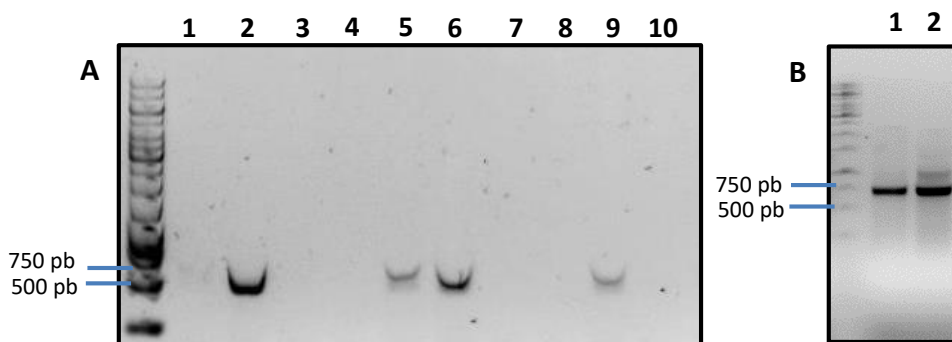


Figura 13. Amplificación mediante PCR del transgen a partir de ADN genómico y RT-PCR de raíces de plantas de soja del genotipo Thorne. **A.** PCR del ADN genómico de raíces de soja transformadas con la construcción pk7-GFP/HF-RPL18. Los carriles del 1-10 corresponden a distintas reacciones de PCR a partir de distintas *hairy-roots*. **B.** RT-PCR de raíces de soja transformadas con la construcción pk7-GFP/HF-RPL18. Los carriles 1 y 2 corresponden a distintas reacciones de RT-PCR a partir de distintas *hairy-roots*. Cebadores utilizados: HF-RPL18 *Fwd* y RPL18 *Rev*. El fragmento esperado era de 660 pb, aproximadamente.

Por el contrario, no fue así de exitosa la detección de la proteína etiquetada (HF-RPL18). Se realizaron varios análisis *western blot* a partir de extractos de proteína total para visualizar la HF-RPL18, pero no se logró detectar la presencia de la misma. El uso de distintos protocolos de extracción de proteínas y de distintas cantidades de dichos extractos para correr en el gel de poliacrilamida, también el uso de diferentes anticuerpos (anti HF, anti-GFP) y sus diluciones no fueron efectivas a la hora de detectar la proteína.

Aquí comenzamos a cuestionarnos si estábamos frente a un problema en la construcción plasmídica que no permitiera la correcta expresión de la proteína etiquetada. Había sido chequeado el marco abierto de lectura mediante secuenciación y no había sido detectado ningún error. Tampoco se hallaron errores en la secuencia nucleotídica. El promotor bajo el que se dirigió la expresión de la proteína fue el 35S el cual es un promotor fuerte, y tampoco debería ser el causante de los problemas. Por estas razones, se contactó a un grupo de la Universidad de Missouri, USA, quienes llevaron a cabo estudios de TRAP en plantas de soja (Castro-Guerrero et al., 2016), y que muy amablemente nos enviaron una alícuota de su construcción que consistía en la proteína RPL18 fusionada a la etiqueta HF en un vector de destino que también contenía GFP, a la que denominamos USA-GFP/HF-RPL18. Esto nos permitió chequear el protocolo que estábamos empleando para la detección de las proteínas (HF-RPL18 y GFP) con una construcción que había sido previamente empleada y con la cual se había reportado la obtención de plantas de soja transgénicas expresando las proteínas transgénicas (Castro-Guerrero et al., 2016). Se trabajó con plantas de soja del genotipo Thorne y se confirmó la transformación de dichas plantas mediante PCR a partir de ADN genómico. Sin embargo, con la nueva construcción

tampoco se logró visualizar la proteína mediante *western blot* utilizando los anticuerpos anti-HF y anti-GFP.

Por otro lado, dado que en las construcciones génicas con las que se trabajó, el gen de la GFP estaba presente en la construcción USA-GFP/HF-RPL18, se optó también por probar la detección de la GFP mediante microscopio confocal y en microscopio de epifluorescencia. Pero debido a la gran autofluorescencia que presentan las raíces (Berg and Beachy, 2008; Donaldson, 2020) no fue posible diferenciar entre las raíces y nódulos transformados y sin transformar. Esto puede deberse a que en caso de que exista la expresión de GFP en las plantas transformadas, no sea lo suficientemente fuerte, sin embargo hay autores que sí lograron distinguir la expresión de GFP en raíces de plantas de soja (Castro-Guerrero et al., 2016).

Igualmente, se decidió realizar ensayos de TRAP a pesar de no tener la certeza de si contábamos con material transgénico ya que en esta metodología además de partir de una cantidad considerable de tejido (15 mL de tejido pulverizado), el eluido de la fracción TRAP debería tener un enriquecimiento en la proteína etiquetada, y por tanto en él sería más fácil su inmunodetección. Además, era de interés adquirir experiencia en la técnica ya que podría emplearse a futuro en plantas modelo donde la transformación es de más fácil consecución.

5.2.3 Ensayos de TRAP

Se realizaron ensayos de TRAP en plantas del genotipo Thorne transformadas con la construcción USA-GFP/HF-RPL18. Se realizó el procedimiento de TRAP según se describe en la sección 4.6.1 empleando una resina de agarosa conjugada al anticuerpo anti-FLAG para la inmunopurificación de los polisomas. En las primeras muestras de TRAP obtenidas luego de la purificación de ARN, si bien no se alcanzaron a visualizar los ARN ribosomales (ARNr, 18S y 28S) en geles de agarosa, sí se logró confirmar la presencia del ARNm de la RPL18 mediante RT-PCR de dichas muestras. A su vez, se utilizaron cebadores para amplificar el gen de una Acuaporina de la familia MIP (Glyma14g06680) como control de otro gen endógeno de soja (**Tabla 5**), con la finalidad de detectar la presencia de distintos tipos de ARNm. Como se puede observar en la **Figura 14**, se logró la amplificación del transcripto de la RPL18 y el de la Acuaporina sugiriendo que se había logrado realizar la purificación de ARN en las muestras de elución del TRAP. Una posible explicación del hecho de que no hayamos observado los ARNr directamente en gel de

agarosa es que la cantidad de los mismos haya sido muy escasa para permitir su visualización directa.

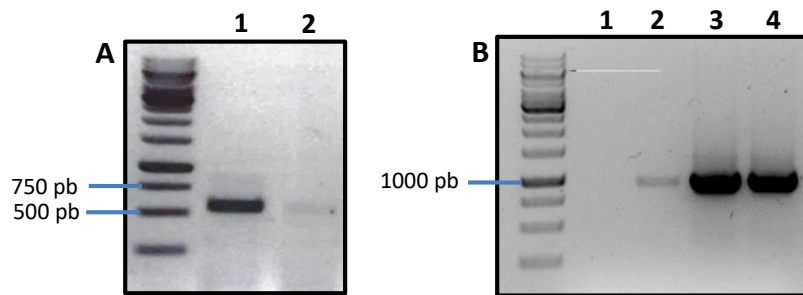


Figura 14. Visualización de productos de RT-PCR en gel de agarosa a partir de muestras obtenidas de la metodología de TRAP en raíces de soja, utilizando cebadores del gen de la RPL18 y de la Acuaporina (Glyma14g06680). **A.** PCR utilizando cebadores de la RPL18. Se utilizó como molde: **1.** Eluido de TRAP luego de la purificación del ARN; **2.** Sobrenadante SN-16. Tamaño esperado del ORF de la RPL18: 560 pb. **B.** PCR utilizando cebadores de la Acuaporina. Se utilizó como molde: **1 y 2.** Eluido de TRAP luego de la purificación del ARN; **3 y 4.** Sobrenadante SN-16; Obtenidos de dos ensayos de TRAP diferentes. Tamaño esperado del ORF de la Acuaporina (Glyma14g06680): 869 pb. (SN-16: sobrenadante obtenido luego de la incubación con el *Buffer* de Extracción de Polisomas).

Apoyándonos en el resultado anterior, se decidió ajustar algunos puntos del protocolo de TRAP para lograr obtener mayor cantidad de ARN purificado: I) Considerando que tal vez la proporción *buffer* PEB: tejido empleada no era óptima para lisar efectivamente las células, se aumentó dicha relación a 1:3 (inicialmente utilizábamos relación 1:2) y se agregó el *buffer* directo al mortero conteniendo la muestra (inicialmente colocábamos la muestra ya molida al tubo falcon y se le agregaba el *buffer* PEB), se maceró manteniendo siempre el mortero en hielo; II) Para aumentar la cantidad de anticuerpo disponible para detectar los ribosomas etiquetados se agregó el doble de cantidad (600 μ L) de la resina anti-FLAG, y se eluyó con el péptido 3XFLAG dos veces más concentrado (400 ng/ μ L). Al realizar estos cambios en el ensayo de TRAP, se logró visualizar por primera vez en un gel de agarosa los ARNr (18S y 28S) en las muestras del eluido de TRAP luego de la purificación del ARN, a partir de raíces y de nódulos (**Figura 15**).

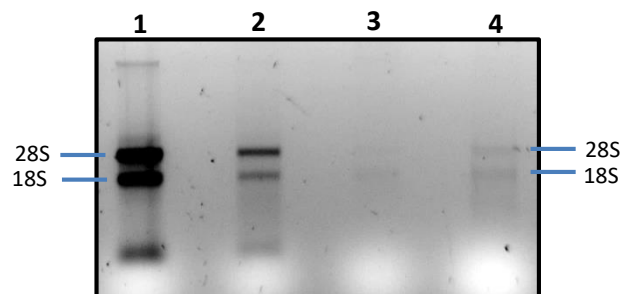


Figura 15. Visualización en gel de agarosa los ARN ribosomales obtenidos a partir de las fracciones “SN-16” y “eluido” de la metodología TRAP en raíces y nódulos de plantas de soja transformadas del genotipo Thorne. Purificación de ARN en muestras de: **1.** SN-16 de nódulo. **2.** SN-16 de raíz. **3.** Eluido de TRAP de nódulo luego de la purificación del ARN. **4.** Eluido de TRAP de raíz luego de la purificación del ARN. (SN-16: sobrenadante obtenido luego de la incubación con el *Buffer* de Extracción de Polisomas).

A su vez, en esta instancia se realizó un análisis *western blot* de muestras de TRAP utilizando el anticuerpo anti-HF y un anticuerpo secundario (anti ratón) que reconocía a dicho anticuerpo primario (ver sección 4.4.4). Si bien el anticuerpo anti-HF es un anticuerpo primario conjugado a HRP, se pensó en la posibilidad de que dicha conjugación se hubiese perdido y que, por tanto, el anticuerpo no pudiera ser evidenciado en el análisis. Las muestras con las que se trabajó fueron las fracciones SN-16 y UBF, muestras del eluido de TRAP y muestras de la resina separadas luego del paso de elución. Para obtener la muestra de la resina, simplemente se le colocó *buffer* de carga al tubo con la resina y se hirvió durante 5 minutos. Como se puede observar en la **Figura 16**, se obtuvo una banda a la altura esperada de 25 kDa en las muestras de TRAP (carriles 7 y 8) realizado en raíces y nódulos de plantas transformadas de genotipo Thorne y, de forma mas evidente, en muestras correspondientes a la resina obtenida de dicho TRAP (carriles 5 y 6). Este resultado sugería que la proteína transgénica de fusión (HF-RPL18) estaba presente en la muestra y había sido retenida por los anticuerpos anti-FLAG de la resina.

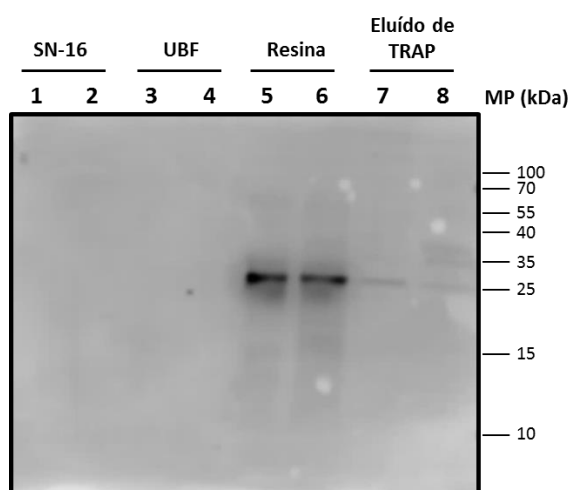


Figura 16. Análisis *western blot* de muestras obtenidas a partir de cuatro fracciones de la metodología TRAP en raíces y nódulos de plantas de soja transformadas del genotipo Thorne. Muestras: **1 y 2.** SN-16. **3 y 4.** UBF. **5 y 6.** Resina separadas luego del paso de elución e incubada con buffer de carga. **7 y 8.** Eluido de TRAP. En todos los casos se encuentran primero las fracciones de raíz (carriles 1, 3, 5 y 7) y luego las fracciones de nódulos (2, 4, 6 y 8). (SN-16: sobrenadante obtenido luego de la incubación con el *Buffer* de Extracción de Polisomas; UBF: Material no unido a la resina).

Para validar estos resultados, se incluyó en los ensayos de TRAP un control negativo consistente en *hairy roots* obtenidas a partir de la transformación de las plantas de soja con el vector vacío (pK7GWIWG2D(II),0, que no contiene HF-RPL18). En primer lugar, se realizó una PCR a partir de ADN genómico y, sorprendentemente, se comprobó en dichas muestras la presencia del transgen (HF-RPL18) cuando se emplearon los cebadores correspondientes (resultados no mostrados). Luego, al realizarse propiamente los ensayos de TRAP con este control negativo, también se observaron en geles de agarosa los ARNr en muestras del eluido de TRAP. Es así que,

en este punto, se comenzó a pensar en la existencia de contaminación con el *A. rhizogenes* transformado en el sustrato utilizado para crecer las plantas (conteniendo el vector pk7-GFP/HF-RPL18), generando falsos positivos en nuestros resultados.

Esta contaminación se pudo haber originado durante el crecimiento de las plantas ya que se trabajó en la misma cámara de crecimiento con los distintos grupos de plantas. Otra posibilidad es que dicha contaminación se haya originado a partir del uso de material de laboratorio contaminado. O quizás, mediante el protocolo de TRAP se estaba eluyendo ARN de la bacteria y no específicamente de las plantas. A raíz de esto, se comenzaron a lavar las raíces con agua estéril y Tween 20 al 0,05% una vez que eran cosechadas, con el fin de eliminar el exceso de *Agrobacterium* que pudiera estar adherido a las mismas; sin embargo, esto no cambió los resultados, es decir, se continuó obteniendo ARN en el eluido final de TRAP de muestras que correspondían a controles negativos.

A su vez, y con el fin de entender lo que estaba ocurriendo, se realizaron ensayos de TRAP partiendo de raíces de plantas de soja traídas del campo, es decir, plantas que no habían tenido contacto alguno con nuestro laboratorio y que, por tanto, no podrían estar contaminadas con el *A. rhizogenes* transformado con nuestra construcción. Se tuvo extremo cuidado con el material utilizado el cual fue esterilizado de forma previa a su uso. En este caso, también se obtuvieron productos de RT-PCR en muestras del eluido de TRAP luego de la purificación del ARN, dando a entender que allí había ARN y que de alguna manera había sido purificado. En este punto se comenzó a pensar que se estaba teniendo un problema de inespecificidad en la elución, es decir, que el ARN obtenido del eluido de TRAP no era sólo ARN de la fracción polisomal, sino que también había ARNs unidos de forma inespecífica a la resina que estaban siendo purificados.

Dado esta nueva hipótesis, se decidió aplicar otro cambio en el protocolo de TRAP que consistió en realizar 6 lavados de la resina anti-FLAG (inicialmente se realizaban 4 lavados) en frío luego de la incubación con el SN-16, con el fin de eliminar efectivamente las uniones inespecíficas. Los resultados obtenidos luego de aplicar estos lavados extra fueron alentadores ya que esta vez no se observó ARN en el eluido de TRAP luego de la purificación, partiendo de raíces de la planta de soja traída del campo (empleada a modo de control negativo). Además, se realizaron RT-PCR empleando cebadores correspondientes a la RPL18 endógena, al transgen y a la acuaporina a partir del eluido de dicho TRAP y no se observó amplificación en ningún caso.

Sin embargo, como último intento para confirmar la presencia de la proteína RPL18 etiquetada mediante análisis *western blot*, se utilizó un anticuerpo anti-HF nuevo (para descartar que el problema no fuese que el anterior se encontrara deteriorado) obteniéndose resultados confusos ya que si bien se observó una banda del tamaño esperado (25 kDa) en las muestras correspondientes al eluido de TRAP de raíces de plantas Thorne, dicha banda también se encontró en las muestras negativas (resultados no mostrados). En base a estos resultados concluimos que el ARN obtenido en las eluciones de TRAP de las muestras evaluadas hasta el momento provenían principalmente de una contaminación de ARN del extracto celular y no de una inmunopurificación específica de ARNm asociados a polisomas.

En este punto, considerando que no se había logrado detectar inicialmente la proteína ribosomal etiquetada en las *hairy roots* mediante ninguna de las técnicas probadas y que los resultados obtenidos de los ensayos de TRAP tampoco evidenciaron que se estuviera trabajando con material transgénico que permitiera específicamente la inmunoprecipitación de los polisomas, resultó evidente que el método mediante el cual se intentó obtener plantas de soja transgénicas (ya sea por la propia metodología de la infección de las plantas o por aspectos relacionados a la virulencia de la bacteria empleada) no fue efectivo al momento de obtener material transgénico o de obtenerlo en suficiente cantidad para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación. Por lo tanto, se decidió cambiar de estrategia para la obtención de polisomas de raíces de soja y dedicar el tiempo restante a poner a punto la purificación de polisomas mediante la metodología convencional de ultracentrifugación en colchones de sacarosa. De hecho, hay un trabajo muy completo de *Ribosome Profiling* en plantas en el cual se realiza la purificación de polisomas mediante ambas metodologías obteniendo resultados consistentes (Juntawong et al., 2014).

No obstante, cabe mencionar que de forma posterior a la realización del trabajo experimental de esta tesis, en nuestro laboratorio se logró obtener raíces transgénicas de soja (expresando GFP) utilizando una nueva cepa K599 de *A. rhizogenes* cedida por el Dr. Germán Robert del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba, Argentina (Listur, 2020) (**Figura 17**). Para ello, se realizaron algunas modificaciones clave en el protocolo de infección de las plántulas que incluyen un procedimiento de selección de la colonia efectiva (la más virulenta) previo al comienzo de cada ensayo de transformación ya que se comprobó que la bacteria pierde muy rápidamente la capacidad de infección. Esto resultados confirman que, a pesar de la alta autofluorescencia que presentan las raíces de soja, cuando la expresión de GFP es fuerte se logra

distinguir al microscopio raíces transformadas de aquellas no transformadas, resultado que es consistente con lo reportado previamente por Castro-Guerrero et al., 2016.

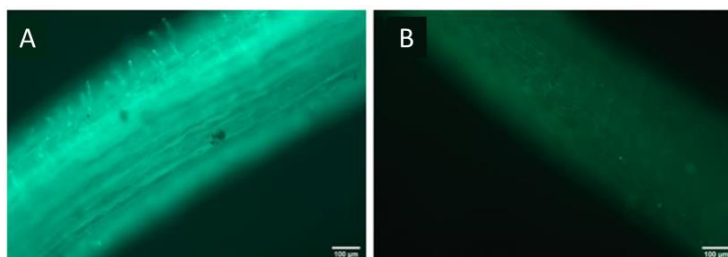


Figura 17. Observación microscópica de distintas hairy-roots. A. Hairy root “positiva o transgénica” expresando GFP. B. Hairy root “negativa” no transgénica. Imágenes extraídas y adaptadas de Listur, 2020.

5.3 Optimización de la purificación de polisomas mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa a partir de raíces de soja y obtención de huellas ribosomales para la metodología de *Ribosome Profiling*

La ultracentrifugación diferencial es la metodología convencional utilizada para la purificación de polisomas, y ha sido ampliamente aplicada desde hace varios años en distintos organismos y tejidos (Breen et al., 1972; Dickson and Brown, 1998; Irwin et al., 1973; Tscherne and Pestka, 1975). En particular en plantas, esta metodología también ha sido ampliamente utilizada para la obtención de polisomas (Coate et al., 2014; Kawaguchi et al., 2004; Zanetti et al., 2005). Generalmente, la estrategia que se emplea para obtener los polisomas es fraccionarlos a partir del extracto celular en un gradiente continuo de sacarosa, coleccionar las distintas fracciones y a continuación purificar el ARN de las fracciones de interés (polisomales). En algunos casos, como en hojas maduras de *Arabidopsis* o tabaco o en endosperma de maíz, los polisomas son lo suficientemente abundantes en los extractos celulares crudos como para poder purificarlos directamente mediante estos gradientes (Mustroph et al., 2009). En otros casos, en los que los polisomas no son tan abundantes, se requiere la concentración de la fracción polisomal mediante un colchón de sacarosa, de forma previa al fraccionamiento (Reynoso, 2013).

Los pasos que se siguieron en este trabajo se detallan en la sección **4.6.2** y se esquematizan en la **Figura 18**. Se utilizó un protocolo para la purificación de polisomas y posterior obtención de huellas ribosomales propuesto por el grupo de colaboradores del Departamento de Genómica

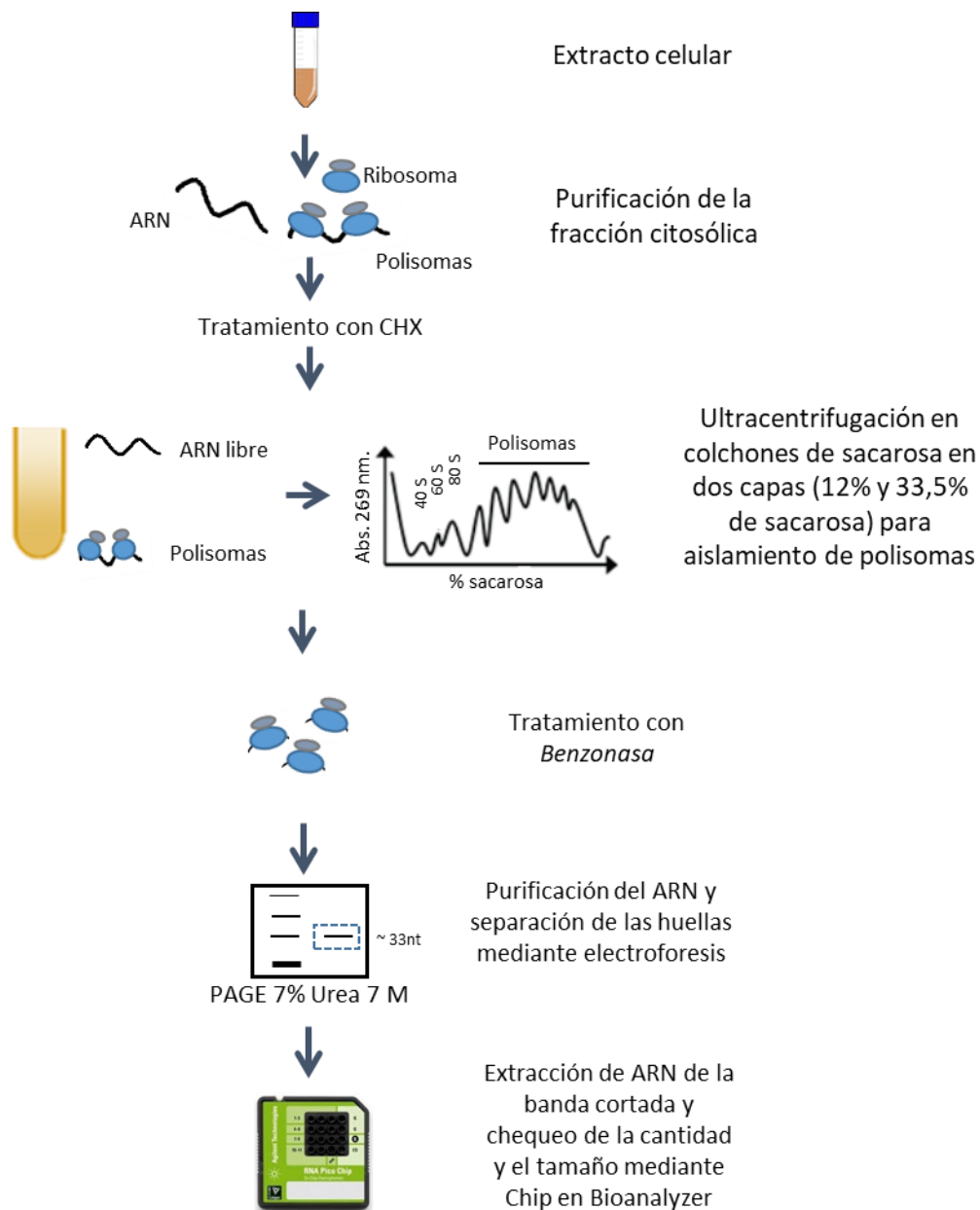


Figura 18. Esquema de los primeros pasos de la metodología seguida para realizar un análisis de Ribosome Profiling en raíces de soja. En la figura se muestran los primeros y principales pasos del protocolo realizado: obtención del extracto celular, purificación de la fracción citosólica, tratamiento con cicloheximida (CHX) para la inmovilización de los ribosomas sobre los ARNm, ultracentrifugación en colchón de sacarosa (capas de 12% y 33,5%) para separar polisomas de monosomas y subunidades ribosomales, tratamiento con la enzima Benzonasa para degradar el ARNm excepto aquellas regiones protegidas por los ribosomas, purificación del ARN restante y corrida electrofórica en gel de poliacrilamida al 7% con urea 7M para la separación de los pequeños ARN de distinto tamaño, purificación de la banda del gel correspondiente a las huellas ribosomales (33 nt, aproximadamente) y análisis en Chip de ARN en un Bioanalyzer.

del IIBCE (Guillermo Eastman y José Sotelo-Silveira). La purificación de los polisomas se realizó mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa (o gradiente discontinuo) de dos fases (12% y 33,5%, capa superior e inferior, respectivamente) para lograr la separación de los

polisomas (que atraviesan las dos capas del colchón y quedan en el fondo del tubo) de monosomas (80S; quedan en la interfase) y subunidades ribosomales (60S y 40S) tal como fue descrito en el trabajo de Eastman en células neuronales de rata (Eastman, 2016).

En nuestro caso, y de forma previa a la purificación de los polisomas mediante los colchones de sacarosa, se comprobó que la concentración de sacarosa seleccionada para dichos gradientes (12% y 33.5%) fuese la adecuada para nuestras muestras mediante ultracentrifugación en gradientes continuos de sacarosa (15-50%). Es así que se realizaron los gradientes de sacarosa según se describe en la sección 4.6.2. En la **Figura 19** se muestra el gráfico obtenido luego de medir absorbancia a 260 nm en un lector de microplacas (Varioskan, Thermo Scientific) con el fin de corroborar la presencia de polisomas en el fondo del tubo donde se realizó el gradiente ya que éstos, como se mencionó previamente, debido a su alto peso molecular, deberían atravesar el gradiente y encontrarse en ese lugar. Por su parte, los monosomas, ribosomas libres y las subunidades ribosomales, al presentar un peso molecular menor, no son capaces de atravesar todo el gradiente y se localizan mas arriba en el mismo.

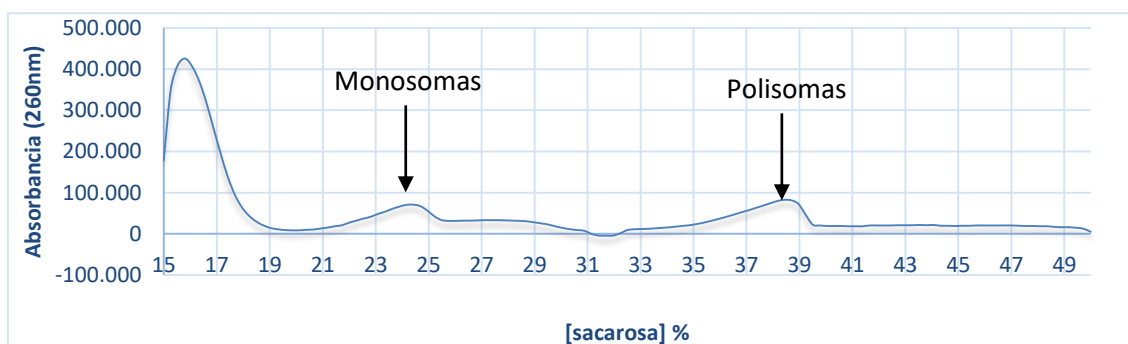


Figura 19. Visualización de polisomas y monosomas de raíces de soja mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. En el gráfico se muestra el registro de la lectura de absorbancia a 260 nm respecto al gradiente de sacarosa (15-50%). Los ribosomas libres, los de menor tamaño, son los que menos migran en el gradiente, seguidos por los monosomas. Los polisomas se observaron a partir de concentraciones de sacarosa en el entorno del 33,5%.

Una vez puesto a punto el protocolo, confirmando la presencia de polisomas en la fracción *pellet*, se realizaron corridas de ultracentrífuga para purificar los polisomas y continuar con la purificación de las huellas ribosomales y la metodología de *Ribosome Profiling*. Cabe mencionar aquí que en este punto también se puede continuar con la metodología de *Polysome Profiling* en la cual los ARNm unidos a los polisomas directamente se purifican (sin necesidad de obtener las huellas) y a continuación se generan las librerías de ADNc.

La metodología de *Ribosome Profiling* consta de un paso esencial que es la digestión de los ARNm con nucleasas para digerir las regiones de dichos ARNm que no estén cubiertas o protegidas por los ribosomas. De esta manera, se purifican y seleccionan fragmentos pequeños de ARN de 33 nucleótidos, aproximadamente, que son esas regiones protegidas por los ribosomas. De esta forma se puede obtener información sobre la posición exacta de los mismos ya que cada huella corresponde a la posición de un ribosoma activo sobre un ARNm. En este caso se trabajó con la enzima Benzonasa y la digestión se realizó luego de la purificación de los polisomas mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa. La elección de la enzima Benzonasa como ARNasa se debe a que esta enzima genera fragmentos ligables, ya listos para los subsecuentes pasos en la producción de las bibliotecas de secuenciación. El uso de otras enzimas como la RNasa I, que generan fragmentos no ligables, implica tener que realizar pasos adicionales previos a la producción de dichas bibliotecas. En la **Figura 20** se presentan los electroferogramas obtenidos en el equipo Bioanalyzer de las muestras antes y después de la digestión de los ARNm con la enzima Benzonasa.

Si bien en esta primera instancia se obtuvo baja cantidad de ARN de las huellas ribosomales (alrededor de 2 ng), que es muy inferior al mínimo necesario para la generación de las bibliotecas de secuenciación (50 ng aproximadamente), logramos confirmar mediante técnicas robustas la presencia de ARN en las muestras de digestión de ARNm asociados a polisomas de raíces de soja. Estos resultados fueron muy esperanzadores y nos permitieron acercarnos a nuestros objetivos planteados inicialmente. A su vez, nos permite comenzar a optimizar algunas condiciones para lograr obtener una mayor cantidad de ARN al final del protocolo (que nos permita continuar con el paso de generación de librerías) y llevarlo a cabo a partir de muestras de las distintas condiciones experimentales ensayadas (plantas “sin restricción hídrica” y plantas con “deficit hídrico” tanto noduladas como no-noduladas), con la seguridad de que la metodología empleada funciona para el tejido con el que trabajamos.

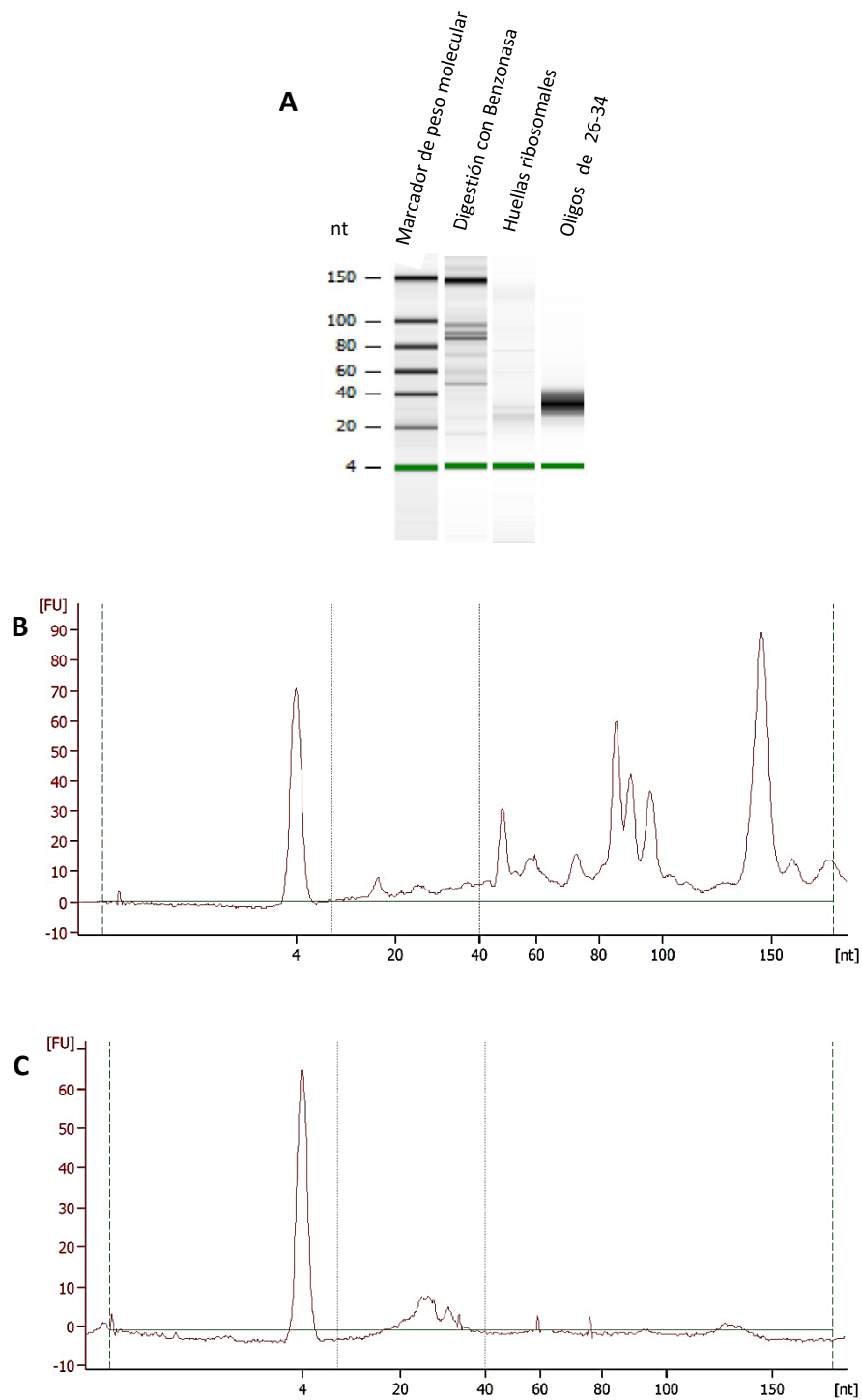


Figura 20. Evaluación de la calidad y cantidad de las huellas ribosomales obtenidas mediante la digestión de los ARNm asociados a polisomas con la enzima Benzonasa. Luego de la corrida electroforética de los productos de la digestión de los ARNm, se recortó la banda del tamaño adecuado (33 nt aproximadamente), se purificó el ARN y éste se analizó en el equipo Bioanalyzer empleando un chip de ARNs pequeños. **A.** Perfil electroforético obtenido luego de la digestión con la Benzonasa y luego de la purificación de las huellas ribosomales. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular y el cuarto carril a oligos entre 26 y 34 nt utilizados como referencia. **B.** Electroferograma correspondiente a la muestra de luego de la digestión con la Benzonasa. **C.** Electroferograma correspondiente a la muestra luego de la purificación de las huellas ribosomales. El eje vertical mide las unidades de fluorescencia (FU) y el eje horizontal describe el tamaño de los fragmentos de ARN, en nucleótidos (nt).

Cabe mencionar que la realización de la metodología por primera vez implica la puesta a punto de distintos pasos del protocolo que incluyen, por ejemplo, la cantidad de tejido o de número de células de partida, la concentración de sacarosa utilizada en los colchones y la purificación de las huellas ribosomales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior extracción de estos pequeños ARNs. Respecto a la purificación de las huellas ribosomales, se puede optimizar la purificación del ARN contenido en la banda asignada a las huellas ribosomales a partir del gel de poliacrilamida, ya que es necesario conocer la movilidad electroforética de la banda correspondiente a las huellas ribosomales y evaluar el mejor procedimiento de purificación. En este trabajo se utilizó el protocolo de purificación de ARN descrito inicialmente por Ingolia y colaboradores (Ingolia et al., 2012) y puesto a punto por el grupo de colaboradores del Departamento de Genómica del IIBCE (Guillermo Eastman y José Sotelo-Silveira). No obstante, se podrían usar kits comerciales para evaluar el rendimiento de los mismos o utilizar el reactivo TRIzol según se reporta en el trabajo de Juntawong et al., 2014 en el cual se realiza *Ribosome Profiling* en plantas de arábido.

Como se mencionó anteriormente, en el protocolo descrito por Reynoso (Reynoso, 2013) en el cual se trabaja con raíces de plantas de *Medicago truncatula*, la purificación de los polisomas se realiza en dos etapas. Primero enriquecen la muestra en polisomas por medio de ultracentrifugación en un colchón de sacarosa 58,2% (1.7 M) y luego fraccionan y seleccionan los polisomas empleando un gradiente continuo de sacarosa (20%-60%). En otros protocolos de *Ribosome Profiling* reportados en plantas (Juntawong et al., 2014; Merchante et al., 2016) también se realiza la purificación de polisomas en dos etapas (concentración de los mismos mediante colchón de sacarosa seguido por fraccionamiento en gradiente), pero, en este caso, es interesante notar que la digestión de los ARNm asociados a polisomas (para generar las huellas) la realizan de forma previa al fraccionamiento en gradiente. Los autores mencionan que de esta manera se pueden purificar los monosomas del resto de los componentes del extracto, ya que una vez que se digieren los polisomas se generan monosomas, y reportan que de esta manera mejora significativamente la calidad de las huellas ribosomales con respecto al protocolo de Ingolia (Ingolia et al., 2009; Merchante et al., 2016).

Recientemente, Chotewutmontri y colaboradores publicaron un protocolo de *Ribosome Profiling* optimizado para hojas de plantas de maíz y probado con éxito en hojas de arábido y tabaco, bastante más simple a los publicados por otros grupos (Chotewutmontri et al., 2018). Estos autores realizan la digestión de los ARNm con la enzima ribonucleasa directamente sobre

el extracto celular y luego purifican los monosomas mediante un colchón de sacarosa, los cuales quedan en el *pellet* en el tubo de ultracentrifuga, y a partir de estos realizan la extracción de ARN. Mas recientemente aún, este protocolo fue adaptado por Kanodia y colaboradores y puesto a punto en raíces de plántulas de maíz (Kanodia et al., 2020). Sería muy interesante probar este protocolo con las raíces de plantas de soja que se obtuvieron en el ensayo descrito en este trabajo ya que quizás de esta manera se podrían obtener las cantidades de huellas ribosomales necesarias para poder realizar las librerías de secuenciación.

Una alternativa para el análisis del traductoma, para los casos en que se obtiene baja cantidad de ARN a partir de huellas ribosomales que no permite realizar un análisis de *Ribosome Profiling*, es, a partir de los polisomas aislados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa, realizar *Polysome Profiling*. Como ya se mencionó en la Introducción, es una metodología que aporta información muy valiosa acerca de la regulación traduccional y, al evitar el paso de la digestión con nucleasas, se obtiene una mayor cantidad de ARN al final del protocolo. En este caso, se obtendrían datos de secuencia de transcritos completos, además de aportar información acerca de la densidad de polisomas según el nivel de expresión de cada transcripto. En el trabajo de Coate y colaboradores (Coate et al., 2014), realizan *Polysome Profiling* en plantas de *Glycine dolichocarpa*, la cual está cercanamente relacionada en términos evolutivos con la soja. En dicho trabajo realizan un análisis global del transcriptoma y del traductoma obteniendo resultados muy interesantes como por ejemplo que un 25% de los genes están regulados a nivel de la traducción.

5.4 Perspectivas

El objetivo inicial de este trabajo fue profundizar en la comprensión del fenómeno de tolerancia a déficit hídrico en plantas leguminosas. La capacidad de estas plantas de responder a dicho estrés ambiental varía dependiendo si se encuentran o no formando parte de una interacción simbiótica, y analizar la regulación génica a nivel traduccional es clave para comprender cuáles mecanismos están detrás de la tolerancia al estrés.

El uso de metodologías como *Ribosome* y *Polysome profiling* proveen una alternativa para la selección de genes candidatos basada en los niveles de asociación de sus ARNm a polisomas. La identificación de nuevos genes regulados a nivel de la traducción requiere de la aplicación de

herramientas de análisis masivo como la secuenciación masiva o la hibridación a microarreglos. El uso de la secuenciación masiva presenta algunas ventajas con respecto al uso de microarreglos, entre las que destacan la detección de transcritos que pueden no estar presente en el microarreglo y la obtención de información de la secuencia de pares de bases. Una de las posibilidades que plantea la secuenciación masiva de muestras de Ribo-Seq y Polysome-Seq es el acceso a las poblaciones de ARNm asociados a polisomas. Estas poblaciones corresponden a ARNm que han superado las etapas de control de calidad y se han asociado a polisomas para su traducción. Esto permite excluir del análisis ARNm nucleares aberrantes o que no han completado su procesamiento. A su vez, estos datos pueden contribuir a la identificación de variantes de *splicing* alternativo, mejorando así la anotación de los modelos génicos del genoma.

Chung y colaboradores publicaron un trabajo reciente en el cual realizan la metodología Ribo-Seq con plantas de *arabidopsis* sometidas a altas temperaturas diurnas. Estos autores reportan, luego de normalizar los datos de Ribo-Seq con respecto a los RNA-Seq, que cerca de 700 genes potenciaron su eficiencia en la traducción en respuesta al cambio de temperatura (Chung et al., 2020). En particular, encontraron que el transcripto de un factor de transcripción (PIF7) aumenta su tasa de traducción en respuesta a alta temperatura, y que esto se debe a que sufre cambio en su estructura (formación de una horquilla en su región no traducida 5') como consecuencia del aumento de temperatura. La acumulación de esta proteína activa procesos morfogénicos dependientes de temperatura en *arabidopsis*. Este artículo evidencia cómo mediante las metodologías que permiten analizar el traductoma se pueden dilucidar procesos específicos de regulación como respuesta a una condición estresante para la planta.

Otra aproximación muy interesante en plantas es el trabajo realizado por Juntawong y colaboradores (Juntawong et al., 2014) quienes llevaron a cabo la metodología Ribo-Seq con plantas de *arabidopsis* bajo condiciones de hipoxia, y reportaron nuevas alternativas de *splicing* para distintos genes, en varios de los cuales la inclusión de un intrón podría significar la generación de una proteína trunca. Estos resultados muestran que mediante Ribo-Seq es posible encontrar variaciones en el *splicing* alternativo que son reguladas dinámicamente proporcionando conocimiento acerca de la producción de proteínas. Otro ejemplo de aplicación de *Ribosome profiling* en plantas es el trabajo realizado por Merchante y colaboradores (Merchante et al., 2015) en el cual se utilizó dicha metodología para detectar cambios a nivel traduccional en respuesta al etileno, que no se pudieran explicar a nivel de la transcripción. Estos autores demostraron que las proteínas EBF (componentes de la vía de señalización del etileno) son reguladas a nivel de la traducción en respuesta al etileno. En el caso puntual de EBF2

observaron que, si bien aumentaban los niveles de ARNm, disminuían los niveles de dicha proteína en respuesta a la hormona. Por tanto, estos autores sugieren la posibilidad de que exista una regulación traduccional mediante bucles de retroalimentación en la vía de señalización generada por el etileno.

El mismo trabajo realizado por Juntawong y colaboradores (Juntawong et al., 2014) que se mencionó previamente, reporta que en condiciones de hipoxia se inhibe la traducción ya que se observa una disminución de las huellas en el codón de iniciación y en el codón de terminación. Este estudio resulta muy interesante ya que la purificación de los polisomas se realiza mediante las mismas dos metodologías que se realizaron en este trabajo de tesis: TRAP y ultracentrifugación diferencial, obteniendo resultados consistentes entre ambos y destacando la ventaja de que mediante la metodología TRAP se reduce la contaminación por mRNPs, aspecto que ya se ha mencionado.

La manipulación de las plantas para introducirles plásmidos o realizar otras modificaciones génicas es un gran desafío comparado a utilizar líneas celulares *in-vitro* diseñadas para tales fines o incluso comparado a modelos animales. Si bien durante este trabajo se presentaron varios inconvenientes que radicaron principalmente en no lograr obtener las plantas transgénicas, y que dificultaron la obtención rápida de resultados, sostenemos que una vez que se logren los resultados deseados, éstos tendrán un impacto significativo en el conocimiento asociado a la búsqueda de los mecanismos responsables de la tolerancia al déficit hídrico, con un objetivo de mejora de la tolerancia en plantas de interés agrícola vinculado al mejoramiento de los cultivos. Además, la identificación de proteínas que están expresadas diferencialmente en respuesta al estrés de manera genotipo dependiente, contribuirá en el futuro a la inclusión de marcadores funcionales que asistan a la selección de genotipos más tolerantes al estrés y que mantengan esta característica cuando están formando simbiosis con rizobios.

Una actividad que se podría realizar con el fin de obtener información de forma rápida acerca de los genes candidatos identificados previamente es trabajar con especies modelo de leguminosas como *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (*M. truncatula*) en las cuales se pueden utilizar líneas mutantes o transgénicas para analizar el rol de cada gen candidato seleccionado cuando se somete la planta frente al déficit hídrico. Las plantas obtenidas por estas estrategias pueden ser sometidas a déficit hídrico para evaluar el rol de estos genes en la respuesta al estrés en plantas noduladas. Gil-Quintana y colaboradores (Gil-Quintana et al., 2015), compararon los proteomas de los nódulos de *M. truncatula* y soja en condiciones de

sequía y observaron una regulación a la baja de todo el proteoma. A su vez, estos autores mencionan el alto grado de similitud entre ambos proteomas. Investigaciones realizadas en *M. truncatula* concluyen que la sequía induce un cambio importante en el perfil metabólico de los nódulos con acumulación de aminoácidos (Pro, His y Trp) y carbohidratos (sacarosa, galactinol, rafinosa y trehalosa) asociado con una disminución de las proteínas de los bacterioides involucradas en el metabolismo del carbono (Larrainzar et al., 2009). En un futuro, nos proponemos evaluar parámetros bioquímicos en plantas modelos modificadas que evidencien la respuesta frente al estrés del nódulo como la capacidad fijadora de N y los niveles de ROS y especies reactivas de nitrógeno. Específicamente, se evaluará la actividad nitrogenasa que es una medida directa sobre la capacidad fijadora de nitrógeno que presenta el nódulo y que a su vez se ha visto que la actividad de misma se ve afectada por el estrés hídrico siendo independientemente de la tasa fotosintética (Durand et al., 1987).

A futuro, en nuestro laboratorio se pretende identificar secuencias o motivos consenso que están presentes en las regiones no traducidas de algunos de los genes para los que se observen evidencias de regulación positiva a nivel traduccional en respuesta al estrés en plantas noduladas. Estos elementos podrían regular la respuesta traduccional durante la asociación simbiótica. La funcionalidad de los elementos reconocidos podría ser evaluada mediante la generación de construcciones que contengan el ORF del gen *gfp* fusionado transcripcionalmente a los elementos identificados. Este tipo de ensayos permitirá la evaluación de la abundancia de las proteínas y de sus transcritos, y se podrá caracterizar cómo estos niveles se modifican durante la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios.

Si bien dentro del objetivo principal de la tesis estaba incluido el análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva (análisis RNA-Seq y Ribo-Seq), debido a los problemas que se presentaron no se alcanzó a realizar dicho análisis en el transcurso de la misma. Sin embargo, contamos con una muy clara y detallada estrategia para realizar los análisis que seguirán a continuación una vez realizada la secuenciación. Se analizarán tres muestras biológicas de cada condición experimental y de ser necesario, por no alcanzar la cantidad mínima de ARN para generar las bibliotecas de secuenciación, cada muestra será un pool de hasta dos ensayos de purificación de polisomas independientes.

Próximamente, la secuenciación de las bibliotecas de Ribo-Seq se realizará en Hi-seq de Illumina (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Y, debido a que es imprescindible para nuestro análisis diferenciar entre aquellos genes que están siendo regulados a nivel traduccional de los que están

siendo regulados a nivel transcripcional, paralelamente se analizará mediante RNA-Seq la abundancia de los ARNm (a partir de la alícuota reservada para ARN total). Para esto, las bibliotecas se construirán según (Juntawong et al., 2014) y la secuenciación se realizará en el mismo servicio que para Ribo-Seq.

Para el procesamiento y análisis de las secuencias obtenidas será utilizando *software* libre y se comenzará por una inspección visual de la calidad, la distribución de tamaños y la determinación de presencia de adaptadores en las lecturas de RNA-Seq y Ribo-Seq con FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), seguido de una limpieza por calidad y eliminación de adaptadores y lecturas cortas con Trimmomatic (doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170). Posteriormente, se procederá al alineamiento contra el genoma de referencia de soja (V2.1, disponible en https://plants.ensembl.org/Glycine_max) utilizando el programa TopHat (doi.org/10.1038/nprot.2012.016), el cual permite “gaps” largos para las lecturas que cubren la unión entre dos exones.

Las pequeñas diferencias existentes en los alineamientos para las muestras correspondientes a los transcriptomas y traductomas, nos permitirá conocer el porcentaje de contaminación con ARN ribosomal (ARNr) presente en las muestras de traductomas. Es necesario mencionar que la contaminación de estos fragmentos de ARNr que se arrastra en las bibliotecas de huellas polisomales, puede llegar a ser muy importante y en algunos casos puede ser necesario realizar substracciones específicas de estos fragmentos mediante oligos biotinilados.

En este paso ya se pueden anticipar la traducción de regiones no conocidas, así como las regiones codificantes de proteínas ya anotadas. La expresión de un gen específico puede ser cuantificada mediante el cálculo de la densidad de *reads* de secuencia para ese gen, para ello se usará el archivo GTF (formato estándar que guarda información génica, “gene transfer format”) para identificar cuantas lecturas fueron alineadas a cada región genómica de interés. Con esa información se generarán métricas relacionadas con el número de exones muestreados, que otros loci (ej. ncRNA) se han secuenciado, y que a su vez permitan identificar potenciales nuevos exones (genes) no predichos en la anotación original del genoma. Luego, con una anotación estructural del genoma actualizada (contemplando los potenciales nuevos exones/genes identificados en nuestro conjunto de datos), se obtendrá una matriz de conteos utilizando el programa RNA-SeQC (doi.org/10.1093/bioinformatics/bts196). Este software permite cuantificar, discriminando las lecturas que mapean enteras a un exón de las que mapean parcialmente a un exón-intrón. La métrica a utilizar en el conteo de lecturas será “RPKM” (*reads*

per kilobase per million mapped reads), que considera la longitud de la región genómica que estamos cuantificando (por ejemplo, un gen), y la cantidad de lecturas que se mapearon de esa muestra. Solo se retendrán aquellas regiones que tengan más de 5 RPKM.

La calidad de los datos obtenidos por Ribo-Seq es evidenciada por la aparición abrupta de una señal proveniente de las huellas ribosomales en 14-15 nt aguas arriba del codón de iniciación, un rápido decaimiento en la señal alrededor de 24-25 nt aguas arriba del codón de *stop*, baja densidad de huellas en 5' y 3' UTR y una periodicidad estricta de 3 nt que representa el largo del codón por cada movimiento de los ribosomas a lo largo del ARNm (Ingolia et al., 2009). Es de esperar que en los datos de Ribo-Seq las regiones no traducidas (5' y 3'-UTRs) presenten niveles de expresión considerablemente bajos al compararlos con los niveles de expresión de la región traducida (CDS). Este fenómeno no ocurre para los datos de RNA-Seq a partir del ARNm total, es decir el componente transcripcional, donde se observan altos niveles de expresión tanto para los UTRs como para los CDS.

Con los datos de conteos se procederá al análisis estadístico de expresión/traducción diferencial entre los genotipos ensayados, utilizando modelos lineales generalizados (distribución binomial negativa, edgeR, doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616), y controlando la tasa de falsos positivos (FDR < 0.05). También se estimará la eficiencia traduccional $TE = \text{rpkm}(\text{foot})/\text{rpkm}(\text{mRNA})$ (Ingolia et al., 2009). Se evaluará la performance de paquetes específicos como tRanslatome (doi.org/10.1093/bioinformatics/btt634), desarrollado para el análisis simultáneo de datos transcriptómicos, traductómicos y proteómicos.

Finalmente, se determinará el enriquecimiento de términos de la Ontología de Genes (GOs) de los genes de expresión/traducción diferencial. Esto permite entre otras funciones, asignarle significado biológico a una lista de genes y conocer las funciones y procesos celulares sobre-representados en dicha lista. Para esto, una vez identificados los genes diferenciales entre tratamientos, se analizará según su función molecular, proceso biológico o compartimento celular (las 3 ramas de GO) qué términos se encuentran sobre o sub-representado entre los genotipos ensayados (o con respecto al genoma completo). La significancia estadística se obtendrá mediante el test exacto de Fisher. En paralelo, y mediante una aproximación de biología de sistemas, se podrán identificar aquellas redes o vías en las que participan los genes diferenciales identificados en este trabajo. Los principales programas a utilizar aquí son la herramienta web DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (doi.org/10.1038/nprot.2008.211; doi.org/10.1093/nar/gkn923) y el *software* comercial Ingenuity Systems© (Redwood City,

California, USA; www.ingenuity.com) (www.qiagen.com/ingenuity) al cual se tiene acceso en el Departamento de Genómica del IIBCE.

6 Conclusiones

- 1) La purificación de polisomas por medio de la metodología TRAP no se logró aplicar en soja en las condiciones de nuestro laboratorio debido a la baja eficiencia de transformación de las hairy roots. Sin embargo, de forma posterior a la realización del trabajo experimental de esta tesis, en el laboratorio se logró mejorar dicha eficiencia de transformación. Este aspecto nos permite ser optimistas en cuanto a poder aplicar con éxito la técnica en el futuro.
- 2) Se lograron purificar polisomas de raíces de plantas de soja mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa.
- 3) Se logró la obtención de huellas ribosomales a partir del ARN purificado de dichos polisomas, si bien la concentración lograda no fue suficiente para continuar con la etapa de generación de librerías y secuenciación masiva.
- 4) Desarrollamos una detallada estrategia para el análisis bioinformático de datos de secuenciación que se aplicará una vez que estos sean obtenidos.
- 5) Se logró la aplicación, generando experiencia, de técnicas novedosas para el laboratorio que permiten el análisis del componente traduccional de la regulación génica, que pueden ser empleadas y servir como punto de partida para estudios en distintas plantas modelo con las que se trabaja.

7 Bibliografía

- Abdel-Haleem, H., Lee, G.J., Boerma, R.H., 2011. Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 122, 935–946. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1500-9>
- Andrews, M. & Andrews, M. E, 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>.
- Aranjuelo, I., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., 2007. Effect of elevated temperature and water availability on CO₂ exchange and nitrogen fixation of nodulated alfalfa plants. *Environ. Exp. Bot.* 59, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.008>
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., Herschlag, D., 2003. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3889–3894. <https://doi.org/10.1073/pnas.0635171100>
- Arribere, J.A., Doudna, J.A., Gilbert, W. V., 2011. Reconsidering Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and P-bodies. *Mol. Cell.* 44, 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.019>
- Ashe, M.P., De Long, S.K., Sachs, A.B., 2000. Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 11, 833–848. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.833>
- Bailey-Serres, J., 2013. Microgenomics: Genome-scale, cell-specific monitoring of multiple gene regulation tiers. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 293–325. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120035>
- Baßler, J., Grandi, P., Gadal, O., Leßmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., Hurt, E., 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol. Cell* 8, 517–529. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00342-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00342-2)
- Berg, R.H., Beachy, R.N., 2008. Fluorescent Protein Applications in Plants. *Methods Cell Biol.* 85, 153–177. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85008-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85008-X)
- Betti, M., Pérez-Delgado, C., García-Calderón, M., Díaz, P., Monza, J., Márquez, A., 2012. Cellular Stress Following Water Deprivation in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Cells* 1, 1089–1106. <https://doi.org/10.3390/cells1041089>

- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Stress-induced Reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 513–521. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.038>
- Boscari, A., Meilhoc, E., Castella, C., Bruand, C., Puppo, A., Brouquisse, R., 2013. Which role for nitric oxide in symbiotic N₂-fixing nodules: Toxic by-product or useful signaling/metabolic intermediate? *Front. Plant Sci.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00384>
- 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, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R.B., Bailey-Serres, J., 2005. Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in Arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann. Bot.* 96, 647–660. <https://doi.org/10.1093/aob/mci217>
- Breen, M.D., Whitehead, E.I., Kenefick, D.G., 1972. Requirement for Extraction of Polyribosomes from Barley Tissue. *Plant Physiol.* 49, 733–739. <https://doi.org/10.1104/pp.49.5.733>
- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R., 2005. Cell biology: Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486–489. <https://doi.org/10.1126/science.1115791>
- Broughton, W.J., Dilworth, M.J., 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125, 1075–1080. <https://doi.org/10.1042/bj1251075>
- Brown, P.O., Botstein, D., 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21, 37. <https://doi.org/10.1038/4462>
- Bucca, G., Pothi, R., Hesketh, A., Möller-Levet, C., Hodgson, D.A., Laing, E.E., Stewart, G.R., Smith, C.P., 2018. Translational control plays an important role in the adaptive heat-shock response of *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 46, 5692–5703. <https://doi.org/10.1093/nar/gky335>
- Castaño, J.P., Giménez, A., Ceroni, M., Furest, J., Aunchayna, R., 2011. Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. INIA, Montevideo.
- Castro-Guerrero, N.A., Cui, Y., Mendoza-Cozatl, D.G., 2016. Purification of Translating Ribosomes and Associated mRNAs from Soybean (*Glycine max*). *Curr. Protoc. Plant Biol.*

- 1, 185–196. <https://doi.org/10.1002/cppb.20011>
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., Frendo, P., 2009. Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. *Mol. Plant* 2, 370–377. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn090>
- Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P., Morales, J., 2017. Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Res.* 45, e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw907>
- Chassé, H., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Glippa, V., Morales, J., Cormier, P., 2016. Cyclin B translation depends on mTOR activity after fertilization in sea urchin embryos. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150318>
- Chilton, M.-D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Francine, C.-D., Tempé, J., 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295, 432–434. <https://doi.org/10.1038/295432a0>
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J., 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6, 325–330. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00483-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00483-9)
- Chotewutmontri, P., Stiffler, N., Watkins, K.P., Barkan, A., 2018. Ribosome profiling in Maize. *Methods Mol. Biol.* 1676, 165–183. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7315-6_10
- Chung, B.Y.W., Balcerowicz, M., Di Antonio, M., Jaeger, K.E., Geng, F., Franaszek, K., Marriott, P., Brierley, I., Firth, A.E., Wigge, P.A., 2020. An RNA thermoswitch regulates daytime growth in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 6, 522–532. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0633-3>
- Clement, M., Lambert, A., Herouart, D., Boncompagni, E., 2008. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene* 426, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.016>
- Coate, J.E., Bar, H., Doyle, J.J., 2014. Extensive translational regulation of gene expression in an allopolyploid (*Glycine dolichocarpa*). *Plant Cell* 26, 136–150. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119966>
- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Lutke, W.K., Taylor, C.G., 2005. Ex vitro composite plants: An inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J.* 43, 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02454.x>
- Davies, E., Larkins, B.A., Knight, R.H., 1972. Polyribosomes from Peas. *Plant Physiol.* 50, 581–584.

<https://doi.org/10.1104/pp.50.5.581>

Davis, S.J., Vierstra, R.D., 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36, 521–528. <https://doi.org/10.1023/A:1005991617182>

Denyer, T., Ma, X., Klesen, S., Scacchi, E., Nieselt, K., Timmermans, M.C.P., 2019. Spatiotemporal Developmental Trajectories in the Arabidopsis Root Revealed Using High-Throughput Single-Cell RNA Sequencing. *Dev. Cell* 48, 840–852. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.022>

Dickson, L.M., Brown, A.J.P., 1998. mRNA translation in yeast during entry into stationary phase. *Mol. Gen. Genet.* 259, 282–293. <https://doi.org/10.1007/s004380050814>

Donaldson, L., 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>

Durand, J.L., Sheely, J.E., Minchin, F.R., 1987. Nitrogenase Activity, Photosynthesis and Nodule Water Potential in Soyabean Plants Experiencing Water Deprivation. *J. Exp. Bot.* 38, 311–321. <https://doi.org/10.1093/jxb/38.2.311>

Geddes, B. A., Kearsley, J., Morton, R., DiCenzo, G. C. & Finan, T. M., 2020. The genomes of rhizobia. in *Advances in Botanical Research* 94, 213–249. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018015118>

Eastman, G., 2016. Análisis del efecto traduccional de Pdc4 en células neuronales mediante secuenciación masiva de huellas polisomales. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.

Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Cogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, L., Klucas', R. V., Becana, M., 1996. Involvement of Activated Oxygen in Nitrate-Induced Senescence of Pea Root Nodules. *Plant Physiol.* 110, 1 187-1 195. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1187>

Estévez, J., Soria-Díaz, M.E., De Córdoba, F.F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., Thomas-Oates, J., Van Brussel, A.A.N., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megías, M., 2009. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 220–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x>

Estrada-de los Santos, P. et al., 2018. Whole genome analyses suggests that *Burkholderia sensu lato* contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen.

- nov.): Implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes* (Basel), 9. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>.
- Finer, J.J., McMullen, M.D., 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 27, 175–182. <https://doi.org/10.1007/BF02632213>
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., Link, A.J., 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* 20, 1294–1307. <https://doi.org/10.1101/gad.1422006>
- Frink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H., 1999. Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1175–1180. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1175>
- Gálvez, L., González, E.M., Arrese-Igor, C., 2005. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exp. Bot.* 56, 2551–2561. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri249>
- Gebauer, F., Preiss, T., Hentze, M.W., 2012. From Cis -Regulatory Elements to Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012245>
- Gil-Quintana, E., Lyon, D., Staudinger, C., Wienkoop, S., González, E.M., 2015. Medicago truncatula and Glycine max: Different Drought Tolerance and Similar Local Response of the Root Nodule Proteome. *J. Proteome Res.* 14, 5240–5251. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00617>
- Gogorcena, Y., Gordon, A.J., Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Witty, J.F., Moran, J.F., Becana, M., 1997. N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol.* 113, 1193–1201. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1193>
- Gong, P., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Zhang, C., Zhang, X., Khurram, Z., Zhang, Y., Wang, T., Fei, Z., Ye, Z., 2010. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *J. Exp. Bot.* 61, 3563–3575. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq167>
- González, E.M., Larrainzar, E., Marino, D., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., Arrese-Igor, C., 2015. Physiological Responses of N₂ -Fixing Legumes to Water Limitation, in: Sulieman, S., Phan

- Tran, L.-S. (Eds.), *Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment: Achievements and Challenges*. Springer, Pamplona, Spain, pp. 5–33. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06212-9>
- Gutiérrez-Boem, F.H., Scheiner, J.D., Rimski-Korsakov, H., Lavado, R.S., 2004. Late season nitrogen fertilization of soybeans: Effects on leaf senescence, yield and environment. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 68, 109–115. <https://doi.org/10.1023/B:FRES.0000019040.02605.ee>
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720–1730. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.1720>
- Halbeisen, R.E., Gerber, A.P., 2009. Stress-dependent coordination of transcriptome and translome in yeast. *PLoS Biol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000105>
- Hansen, J., Jørgensen, J.E., Stougaard, J., Marcker, K.A., 1989. Hairy roots - a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep.* 8, 12–15. <https://doi.org/10.1007/BF00735768>
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Woolford, J.L., 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol. Cell* 8, 505–515. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00344-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00344-6)
- Heiman, M., Kulicke, R., Fenster, R.J., Greengard, P., Heintz, N., 2014. Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* 9, 1282–1291. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.085>
- Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D. V., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T., Horsch, R.B., 1988. Production of transgenic soybean plants using agrobacterium-mediated DNA transfer. *Nat. Biotechnol.* 6, 915–922. <https://doi.org/10.1038/nbt0888-915>
- Hungria, M., Franco, A.A., Sprent, J.I., 1993. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 149, 103–109. <https://doi.org/10.1007/BF00010767>
- Ingolia, N.T., 2016. Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell* 165, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.066>
- Ingolia, N.T., 2014. Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* 15, 205–213. <https://doi.org/10.1038/nrg3645>

- Ingolia, N.T., Brar, G.A., Rouskin, S., McGeachy, A.M., Weissman, J.S., 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat. Protoc.* 7, 1534–1550. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.086>
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., Weissman, J.S., 2009. Genome-Wide Analysis in Vivo of Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* 324, 218–23. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
- Irwin, C.C., Akagi, J.M., Himes, R.H., 1973. Ribosomes, polyribosomes, and deoxyribonucleic acid from thermophilic mesophilic, and psychrophilic clostridia. *J. Bacteriol.* 113, 252–262. <https://doi.org/10.1128/jb.113.1.252-262.1973>
- Isidoro Losada, A., Ulloa, A., Göbel, B., Góngora-mera, M., Dietz, K., Gras, C., León, C.M.L., Manuel-Navarrete, D., Pugley, D.D., Ojeda, D., Scholz, I., Melo, J.B., Echaide, J., Wintersteen, K., Redclift, M., Guimarães, R.P., Motta, R., Ausdal, S. van, 2014. Desigualdades socioambientales en América Latina. Colombia.
- Jiao, Y., Meyerowitz, E.M., 2010. Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol. Syst. Biol.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.76>
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B., 2006. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 19–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- Jumrani, K., Bhatia, V.S., 2019. Identification of drought tolerant genotypes using physiological traits in soybean. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 25, 697–711. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00665-5>
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., Bailey-Serres, J., 2014. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E203–E212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317811111>
- Kanodia, P., Vijayapalani, P., Srivastava, R., Bi, R., Liu, P., Miller, W.A., Howell, S.H., 2020. Control of translation during the unfolded protein response in maize seedlings: Life without PERKs. *Plant Direct* 4, 1–17. <https://doi.org/10.1002/pld3.241>
- Karginov, F. V., Hannon, G.J., 2013. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress

- reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes Dev.* 27, 1624–1632. <https://doi.org/10.1101/gad.215939.113>
- Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J., 2002. Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 460–465. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00290-X)
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A., Bailey-Serres, J., 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38, 823–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02090.x>
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C.D.T., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., Gresshoff, P.M., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat. Protoc.* 2, 948–952. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.141>
- King, C.A., Purcell, L.C., Bolton, A., Specht, J.E., 2014. A possible relationship between shoot N concentration and the sensitivity of N₂ fixation to drought in soybean. *Crop Sci.* 54, 746–756. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.04.0271>
- King, H.A., Gerber, A.P., 2016. Translatome profiling: Methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genomics* 15, 22–31. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu045>
- Krishnamurthy, A., Ferl, R.J., Paul, A.L., 2018. Comparing RNA-Seq and microarray gene expression data in two zones of the *Arabidopsis* root apex relevant to spaceflight. *Appl. Plant Sci.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1002/aps3.1197>
- Kunert, K.J., Vorster, B.J., Fenta, B.A., Kibido, T., Dionisio, G., Foyer, C.H., 2016. Drought stress responses in soybean roots and nodules. *Front. Plant Sci.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01015>
- L'taief, B., Sifi, B., Zaman-Allah, M., Drevon, J.J., Lachaâl, M., 2007. Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *J. Plant Physiol.* 164, 1028–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.016>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat. Publ. Gr.* 228, 726–734. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crété, P., Voinnet, O., Robaglia, C., 2009. Biochemical Evidence for Translational Repression by *Arabidopsis* MicroRNAs. *Plant Cell* 21, 1762–1768. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063412>

- Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S., 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 169, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Larrainzar, E., Gil-Quintana, E., Arrese-Igor, C., González, E.M., Marino, D., 2014. Split-root systems applied to the study of the legume-rhizobial symbiosis: What have we learned? *J. Integr. Plant Biol.* 56, 1118–1124. <https://doi.org/10.1111/jipb.12231>
- Larrainzar, E., Wienkoop, S., Scherling, C., Kempa, S., Ladrera, R., Arrese-Igor, C., Weckwerth, W., González, E.M., 2009. Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 1565–1576. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1565>
- Larsson, O., Tian, B., Sonenberg, N., 2013. Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012302>
- Libault, M., Farmer, A., Joshi, T., Takahashi, K., Langley, R.J., Franklin, L.D., He, J., Xu, D., May, G., Stacey, G., 2010. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J.* 63, 86–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04222.x>
- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A., Altier, N., 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 161, 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.005>
- Listur, M.B., 2020. Eficiencia de la Transgénesis Transitoria en Variedades de Soja Resistentes y Susceptibles a Sequía. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Liu, F., Andersen, M.N., Jacobsen, S.E., Jensen, C.R., 2005. Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environ. Exp. Bot.* 54, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.05.002>
- López-Arredondo, D.L., Sánchez-Calderón, L., Yong-Villalobos, L., 2017. Molecular and genetic basis of plant macronutrient use efficiency: Concepts, opportunities, and challenges, in: *Plant Macronutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants*. pp. 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00001-6>

- Lukoszek, R., Feist, P., Ignatova, Z., 2016. Insights into the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-Seq. *BMC Plant Biol.* 16, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0915-0>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings (Pearson).
- Marino, D., Damiani, I., Gucciardo, S., Mijangos, I., Pauly, N., Puppo, A., 2013. Inhibition of nitrogen fixation in symbiotic *Medicago truncatula* upon Cd exposure is a local process involving leghaemoglobin. *J. Exp. Bot.* 64, 5651–5660. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert334>
- Mašek, T., Valášek, L., Pospíšek, M., 2011. Polysome Analysis and RNA Purification from Sucrose Gradients. *Methods Mol. Biol.* 703, 293–308. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_20
- Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J., Becana, M., 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 121, 97–111. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.97>
- Mazzoni-Putman, S.M., Stepanova, A.N., 2018. A plant biologist’s toolbox to study translation. *Front. Plant Sci.* 9, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00873>
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P., 1988. Stable Transformation of Soybean (*Glycine Max*) by Particle Acceleration. *Nat. Biotechnol.* 6, 923–926. <https://doi.org/10.1038/nbt0888-923>
- Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Puppo, A., Brouquisse, R., 2011. Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Sci.* 181, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.007>
- Merchante, C., Brumos, J., Yun, J., Hu, Q., Spencer, K.R., Enríquez, P., Binder, B.M., Heber, S., Stepanova, A.N., Alonso, J.M., 2015. Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell* 163, 684–697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.036>
- Merchante, C., Hu, Q., Heber, S., Alonso, J., Stepanova, A., 2016. A Ribosome Footprinting Protocol for Plants. *Bio-Protocol* 6, 1–34. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1985>
- MGAP-DIEA, 2020. Anuario Estadístico Agropecuario 2020 [WWW Document]. URL

<http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea>

Miransari, M., Riahi, H., Eftekhar, F., Minaie, A., Smith, D.L., 2013. Improving Soybean (*Glycine max* L.) N₂ Fixation under Stress. *J. Plant Growth Regul.* 32, 909–921. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9335-7>

Mitra, R.M., Long, S.R., 2004. Plant and Bacterial Symbiotic Mutants Define Three Transcriptionally Distinct Stages in the Development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *Plant Physiol.* 134, 595–604. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031518>

Mnasri, B., Aouani, M.E., Mhamdi, R., 2007. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1744–1750. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.030>

Montañez, A., Danso, S.K.A., Hardarson, G., 1995. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Appl. Soil Ecol.* 2, 165–174. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(95\)00052-M](https://doi.org/10.1016/0929-1393(95)00052-M)

Mustroph, A., Piyada, J., Bailey-Serres, J., 2009. Isolation of Plant Polysomal mRNA by Differential Centrifugation and Ribosome Immunopurification Methods. *Plant Syst. Biol.* 553, 109–126. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-563-7_6

Non Renseigné, S.U., Iqbal, M., 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 23, 407–418. <https://doi.org/10.1051/agro>

Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., Hardesty, B., 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246, 174–181.

Onouchi, H., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Kawasaki, D., Nagami-Yamashita, Y., Murota, K., Kezuka-Hosomi, A., Chiba, Y., Naito, S., 2008. Nascent peptide-mediated translation elongation arrest of *Arabidopsis thaliana* CGS1 mRNA occurs autonomously. *Plant Cell Physiol.* 49, 549–556. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn028>

Orchard, V.A., Cook, F.J., 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biol. Biochem.* 15, 447–453.

- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P., 2014. Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Parrott, W.A., Hoffman, L.M., Hildebrand, D.F., Williams, E.G., Collins, G.B., 1989. Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep.* 7, 615–617. <https://doi.org/10.1007/BF00272042>
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J., 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 180–201. <https://doi.org/10.1128/membr.64.1.180-201.2000>
- Postma, J., van Veen, J.A., Walter, S., 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 21, 437–442. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90156-9)
- Prévost, D., Bertrand, A., Juge, C., Chalifour, F.P., 2010. Elevated CO₂ induces differences in nodulation of soybean depending on bradyrhizobial strain and method of inoculation. *Plant Soil* 331, 115–127. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0238-0>
- Reynoso, M., 2013. “Análisis del traductoma en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*.” Instituto de Biotecnología y Biología Molecular UNLP - CONICET.
- Reynoso, M.A., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., 2013. Insights into post-transcriptional regulation during legume-rhizobia symbiosis. *Plant Signal. Behav.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.4161/psb.23102>
- Rosenzweig, C., Karoly, D., Vicarelli, M., Neofotis, P., Wu, Q., Casassa, G., Menzel, A., Root, T.L., Estrella, N., Seguin, B., Tryjanowski, P., Liu, C., Rawlins, S., Imeson, A., 2008. Attributing physical and biological impacts to anthropogenic climate change. *Nature* 453, 353–357. <https://doi.org/10.1038/nature06937>
- Roy, P.J., Stuart, J.M., Lund, J., Kim, S.K., 2002. Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 418, 975–979. <https://doi.org/10.1038/nature01012>
- Sablok, G., Powell, J.J., Kazan, K., 2017. Emerging Roles and Landscape of Translating mRNAs in Plants 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01443>
- Santarém, E.R., Trick, H.N., Essig, J.S., Finer, J.J., 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-

- mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17, 752–759.
- Savka, M.A., Ravillion, B., Noel, G.R., Farrand, S.K., 1990. Induction of Hairy Roots on Cultivated Soybean Genotypes and Their Use to Propagate the Soybean Cyst Nematode. *Phytopathology* 80, 503–508. <https://doi.org/10.1094/phyto-80-503>
- Sawchik, J. y Ceretta, S., 2005. Consumo de agua por sojas de distintos grupos de madurez en diferentes ambientes de producción. Jornada técnica de cultivos de verano, 41-45. Montevideo: INIA. (Serie Actividades de Difusión, N° 417).
- Schwanhüsser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Serraj, R., Roy, G., Drevon, J.J., 1994. Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiol. Plant.* 91, 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00414.x>
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D., 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 5, 777–784. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.08050777.x>
- Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A., Kuchuk, N.V., 2006. Comparison of Several Nicotiana Species as Hosts for High-Scale Agrobacterium-Mediated Transient Expression. *Biotechnology Bioeng.* 96, 608–614. <https://doi.org/10.1002/bit.21075> ABSTRACT:
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115, 327–334. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.327>
- Shulse, C.N., Cole, B.J., Ciobanu, D., Lin, J., Yoshinaga, Y., Gouran, M., Turco, G.M., Zhu, Y., Malley, R.C.O., Brady, S.M., Dickel, D.E., 2019. High-Throughput Single-Cell Transcriptome Profiling of Plant Cell Types. *Cell Rep.* 27, 2241–2247. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.054> High-Throughput
- Signorelli, S., Sainz, M., Tabares-da Rosa, S., Monza, J., 2020. The Role of Nitric Oxide in Nitrogen Fixation by Legumes. *Front. Plant Sci.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00521>
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes:

Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>

Spangenberg, L., Shigunov, P., Abud, A.P.R., Cofré, A.R., Stimamiglio, M.A., Kuligovski, C., Zych, J., Schittini, A. V., Costa, A.D.T., Rebelatto, C.K., Brofman, P.R.S., Goldenberg, S., Correa, A., Naya, H., Dallagiovanna, B., 2013. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Res.* 11, 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.002>

Sullivan, C.Y., Eastin, J.D., 1974. Plant physiological responses to water stress. *Agric. Meteorol.* 14, 113–127. [https://doi.org/10.1016/0002-1571\(74\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0002-1571(74)90014-4)

Sun, Y., Wang, C., Chen, H.Y.H., Ruan, H., 2020. Response of plants to water stress: A meta-analysis. *Front. Plant Sci.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00978>

Talibart, R., Jebbar, M., Gouffi, K., Pichereau, V., Gouesbet, G., Blanco, C., Bernard, T., Pocard, J.A., 1997. Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4657–4663. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4657-4663.1997>

Tebaldi, T., Re, A., Viero, G., Pegoretti, I., Passerini, A., Blanzieri, E., Quattrone, A., 2012. Widespread uncoupling between transcriptome and translome variations after a stimulus in mammalian cells. *BMC Genomics* 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-220>

Tenenbaum, S.A., Carson, C.C., Lager, P.J., Keene, J.D., 2000. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14085–14090. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14085>

Thermann, R., Hentze, M.W., 2007. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875–878. <https://doi.org/10.1038/nature05878>

Traubenik, S., Reynoso, M.A., Hobecker, K., Lancia, M., Hummel, M., Rosen, B., Town, C., Bailey-Serres, J., Blanco, F., Zanetti, M.E., 2020. Reprogramming of root cells during nitrogen-fixing symbiosis involves dynamic polysome association of coding and noncoding RNAs. *Plant Cell* 32, 352–373. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00647>

Tscherne, J.S., Pestka, S., 1975. Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 479–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.8.4.479>

- Uesono, Y., Toh-e, A., 2002. Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 277, 13848–13855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108848200>
- Uruguay XXI, 2020. Informe Sectorial Agronegocios [WWW Document]. URL www.uruguayxxi.gub.uy
- Uruguay XXI, 2019. Oportunidades de Inversión Agronegocios [WWW Document]. URL www.uruguayxxi.gub.uy
- Van Heerden, P.D.R., De Beer, M., Mellet, D.J., Maphike, H.S., Foit, W., 2007. Growth media effects on shoot physiology, nodule numbers and symbiotic nitrogen fixation in soybean. *South African J. Bot.* 73, 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.05.009>
- Van Hoof, A., Wagner, E.J., 2011. A brief survey of mRNA surveillance. *Trends Biochem. Sci.* 36, 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.07.005>
- Vanderlinde, E.M., Harrison, J.J., Muszyński, A., Carlson, R.W., Yost, R.J.T.C.K., 2010. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00824.x>. Identification
- Veena, V., Taylor, C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 43, 383–403. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Velthof, G.L., Oudendag, D., Witzke, H.P., Asman, W.A.H., Klimont, Z., Oenema, O., 2009. Integrated Assessment of Nitrogen Losses from Agriculture in EU-27 using MITERRA-EUROPE. *J. Environ. Qual.* 38, 402–417. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0108>
- Vincent, J., 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*, IBP Handbo. ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Vogel, C., Marcotte, E.M., 2013. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13, 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Wang, T., Cui, Y., Jin, J., Guo, J., Wang, G., Yin, X., He, Q.Y., Zhang, G., 2013. Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific. *Nucleic Acids Res.* 41, 4743–4754. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt178>

- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Warner, J.R., Knopf, P.M., Rich, A., 1962. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 49, 122–129. <https://doi.org/10.1073/pnas.49.1.122>
- Wei, C.-L., MacMillan, S.E., Harshey, J.W.B., 1995. Protein Synthesis Initiation Factor eIF-1A Is a Moderately Abundant RNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 270, 5764–5771.
- White, F.F., Nester, E.W., 1980. Hairy root: Plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 141, 1134–1141. <https://doi.org/10.1128/jb.141.3.1134-1141.1980>
- Xia, B., Etchegaray, J.P., Inouye, M., 2001. Nonsense Mutations in *cspA* Cause Ribosome Trapping Leading to Complete Growth Inhibition and Cell Death at Low Temperature in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 35581–35588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103871200>
- Xiao, Y.L., Redman, J.C., Monaghan, E.L., Zhuang, J., Underwood, B.A., Moskal, W.A., Wang, W., Wu, H.C., Town, C.D., 2010. High throughput generation of promoter reporter (GFP) transgenic lines of low expressing genes in *Arabidopsis* and analysis of their expression patterns. *Plant Methods* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-18>
- Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J., 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium Ti* and *Ri* plasmids in plants. *Cell* 56, 193–201. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90892-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90892-1)
- Zanetti, M.E., Chang, I.-F., Gong, F., Galbraith, D.W., Bailey-Serres, J., 2005. Immunopurification of Polyribosomal Complexes of *Arabidopsis* for Global Analysis of Gene Expression. *Breakthr. Technol.* 138, 1–2. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059477>
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

