

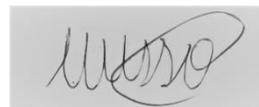
Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**Participación de autofagia en respuestas
locales y sistémicas en interacciones compatibles
e incompatibles entre leguminosas y rizobios.**

Tesista: Musso, Manuel

Firma:



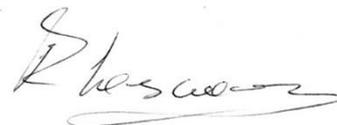
Director: Robert, German

Firma:



Co-director: Lascano, Hernán Ramiro

Firma:



AÑO 2024

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

Participación de autofagia en respuestas locales y sistémicas en interacciones compatibles e incompatibles entre leguminosas y rizobios.

Alumno: Musso, Manuel

Director: Robert, German

Co-director: Lascano, Hernán Ramiro

Tribunal Examinador

● Nombre y Apellido: González, Claudio Alejandro.

Firma:



● Nombre y Apellido: Melchiorre, Mariana Noemí.

Firma:



Dra. MARIANA MELCHIORRE
Prof. Adj. Procesos Biotecnológicos
Esc. Ing. Química FCEFyN - UNC
Investigadora CONICET - INTA

● Nombre y Apellido: Martini, Carolina María

Firma:



● Calificación: 10 (Diez)

● Fecha: 29/02/2024

Contenido

RESUMEN	4
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
Interacción leguminosa-rizobio	5
Respuestas locales en la interacción leguminosa-rizobio	6
Respuestas sistémicas en la interacción leguminosa-rizobio	9
Autofagia y simbiosis	10
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	19
Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de las implicancias de la autofagia en la interacción leguminosa-rizobio	19
Obtención de raíces transgénicas GFP- <i>Atg8</i>	19
Caracterización de la producción de EAO local y sistémica en interacciones compatibles e incompatibles entre <i>G. max</i> y <i>B. diazoefficiens</i> .	22
Modulación local y sistémica del proceso de autofagia y respuestas de defensa en interacciones compatibles e incompatibles.	25
DISCUSIÓN	29

RESUMEN

Varios estudios han relacionado la autofagia con la inmunidad de las plantas, desde que se van descubriendo roles selectivos de la autofagia en las interacciones entre plantas y microorganismos patogénicos. Si bien trabajos previos han postulado la contribución de autofagia en la simbiosis leguminosa-rizobio, hasta el momento no se han reportado evidencias directas de su rol en el establecimiento de la relación mutualista con rizobios. Con el objetivo de indagar en las funciones asociadas a este proceso en la simbiosis *Glycine max-Bradyrhizobium diazoefficiens*, en este estudio, investigamos la modulación de autofagia a nivel local (raíz), donde ocurre la interacción entre los organismos, y a nivel sistémico (hojas), a distintos tiempos luego de la inoculación. Asimismo, investigamos la participación de autofagia en interacciones simbióticas compatibles (reconocimiento de rizobio que conduce a la formación de nódulos), como incompatibles (reconocimiento de rizobio que genera una respuesta de defensa e inhibición de la nodulación). Finalmente, realizamos estudios de genómica funcional de diferentes genes implicados en autofagia (PI3K, Atg6 y Atg4) en raíces transgénicas de soja y sus efectos sobre la nodulación. Los resultados obtenidos en este trabajo indican una modulación diferencial de componentes moleculares asociados a la autofagia dependiendo de la compatibilidad/incompatibilidad entre los socios.

Palabras clave

Simbiosis, leguminosa-rizobio, autofagia, interacción.

SUMMARY

Several studies have linked autophagy to plant immunity, and selective roles of autophagy in interactions between plants and pathogenic microorganisms are being discovered. While previous works have postulated the contribution of autophagy in legume-rhizobium symbiosis, direct evidence of its role in establishing the mutualistic relationship with rhizobia has not been reported so far. With the aim of investigating the functions associated with this process in the *Glycine max-Bradyrhizobium diazoefficiens* symbiosis, this study explores the modulation of autophagy at a local level (roots), where the interaction between organisms occurs, and at a systemic level (leaves), at different times after inoculation. Additionally, we examine the involvement of autophagy in compatible symbiotic interactions (rhizobial recognition leading to nodule formation) as well as incompatible interactions (rhizobial recognition triggering a defense response and inhibiting nodulation). Finally, functional genomics studies of different genes involved in autophagy (PI3K, Atg6, and Atg4) were conducted in transgenic soybean roots. The results obtained in this work indicate a differential modulation of molecular components associated with autophagy depending on the compatibility/incompatibility between the partners.

Keywords

Autophagy, legume-rhizobium symbiosis, interaction.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de nitrógeno (N) es uno de los factores externos más importantes que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los compuestos nitrogenados inorgánicos utilizables para las plantas están típicamente presentes en el suelo en forma de nitrato y amonio. A pesar de que es el más abundante en la atmósfera, el N se encuentra como un gas extremadamente estable y muy poco aprovechable para los seres vivos. No obstante, una parte importante del ciclo natural del N incluye lo que se denomina fijación biológica del N (FBN). Esta es llevada a cabo por microorganismos que en vida libre o en asociación simbiótica con plantas del grupo de las leguminosas, tales como soja, pueden reducir el N gaseoso a temperatura y presión normales, dentro de órganos especializados neoformados llamados nódulos, utilizando solo energía metabólica en forma de ATP y poder reductor. Estas interacciones simbióticas son consideradas piezas claves en la función y mantenimiento de muchos ecosistemas (Abbott y Murphy 2003). Los microorganismos que poseen la capacidad de fijar N dentro de estructuras especializadas denominadas nódulos, pertenecen al grupo de los rizobios. Esta simbiosis entre leguminosas y rizobios no es obligatoria; mientras que condiciones limitantes de N favorecen esta interacción simbiótica, una alta disponibilidad de N la inhibe.

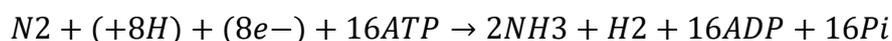
En los sistemas agrícolas el suministro de N como fertilizante ha contribuido significativamente al incremento en el rendimiento de los cultivos, aunque representa un mayor costo en el manejo de estos. Más importante aún, las plantas son capaces de utilizar sólo el 30-40 % del N aplicado, mientras que el 60 % restante se pierde a través de una combinación de lixiviación, escorrentía superficial, desnitrificación, volatilización y consumo microbiano (Raun y Johnson, 1999). Además del incremento en los niveles de óxido nitroso (N₂O) en la atmósfera (unos de los gases de efecto invernadero más relevantes por su contribución al calentamiento global), la aplicación de fertilizantes nitrogenados (los cuales se lavan fácilmente de la tierra por las lluvias o el riego) escurre hasta ríos, lagos y mares. Esta contaminación de las aguas favorece el crecimiento descontrolado de ciertas especies de algas, promoviendo procesos de eutroficación, transformando los ecosistemas naturales y reduciendo la biodiversidad. En este contexto de necesidad de aportar a la sustentabilidad de la actividad agrícola, tanto económica como ambiental; la optimización de la FBN asociada a la interacción simbiótica leguminosa-rizobio es de fundamental importancia.

Interacción leguminosa-rizobio

La interacción simbiótica compatible leguminosa-rizobio que conduce a la formación de los nódulos, nuevos órganos desarrollados en la raíz donde ocurre la FBN, no es obligada. Mientras que condiciones limitantes de N favorecen esta interacción simbiótica, una alta disponibilidad de N la inhibe (Ferguson et al., 2018). La formación de nódulos depende de dos procesos separados, pero altamente coordinados: la infección por los rizobios y la organogénesis del nódulo que ocurren en las capas de células epidérmicas y corticales de la raíz, respectivamente (Fig. 1). La infección se produce a través de una estructura tubular derivada de la planta que crece en forma polar desde la epidermis hacia el cortex radical, conocida como hilo de infección. En las simbiosis leguminosas rizobios más evolucionada y específicas, la interacción comienza con la

adhesión de la bacteria a nivel de los pelos radicales en activo crecimiento, produciendo la redirección del crecimiento polar y la consecuente inducción del curvado o “curling” de los mismos. A partir de aquí, la membrana plasmática del pelo de la raíz se invagina y comienza a alargarse hacia el interior de la célula epidérmica formando el hilo de infección (Ibáñez; et al. 2017) (Fig. 1). Al mismo tiempo, la organogénesis de los nódulos se inicia en la corteza, donde las células han reactivado su ciclo celular, haciendo que la mitosis forme los primordios de los nódulos. Los hilos de infección crecen hasta el interior de la raíz para alcanzar los primordios de los nódulos, las bacterias se internalizan por endocitosis en estructuras similares a orgánulos llamados simbiosomas, donde se diferencian a bacteroides y adquieren la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

Esta diferenciación de bacteria a bacteroide induce la expresión de genes encargados de llevar adelante el proceso de FBN. Los bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico en amonio gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa en una reacción altamente demandante de energía ya que requiere 16 moléculas de ATP y 8 equivalentes de reducción para generar amoniaco de acuerdo a la reacción (Hoffman et al., 2009):



La reacción de este complejo enzimático es altamente sensible al oxígeno, por lo que a nivel nodular se establecen condiciones para el control de las concentraciones de este gas, tales como barreras difusionales de células osmocontractiles, quelado y transporte por leghemoglobina hacia los bacteroides generando así condiciones de microaerobiosis.

El éxito del establecimiento de la simbiosis depende del reconocimiento del socio adecuado por parte de la planta. Este reconocimiento genético determina el tipo de asociación entre los socios: compatible, cuando conduce a la formación de nódulos; incompatible, cuando el reconocimiento imposibilita la simbiosis (desarrollado en la sección *Respuestas locales en la interacción leguminosa-rizobio*). El establecimiento y número de nódulos, están regulados tanto a nivel local como sistémico (Gage, 2004; Ferguson et al., 2018; Roy et al., 2020). Estas regulaciones están relacionadas con mecanismos de inmunidad de la planta (Gourion et al., 2015; Cao et al., 2017; Sugawara et al., 2018; Roy et al., 2020), las cuales a nivel sistémico inducen un estado de alerta o “priming” denominado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) que activa mecanismos de defensas de manera más rápida y eficiente frente a condiciones de estrés biótico y abiótico posteriores. (Fernandez-göbel et al., 2019; Tonelli et al., 2020).

Respuestas locales en la interacción leguminosa-rizobio

A nivel local, y en el contexto de esta Tesina, destacamos dos mecanismos importantes implicados en la especificidad y mantenimiento de la simbiosis: la secreción por parte del rizobio de factores Nod (lipoquitos-oligosacaridos), y de efectores extracelulares o inyectados en el citosol de las células del hospedante, ambos percibidos específicamente por diferentes clases de receptores (Gage, 2004; Miwa and Okazaki, 2017; Ferguson et al., 2018; Roy et al., 2020). Los factores Nod son percibidos por

receptores específicos tipo quinasa LYSM (Lysin motif receptor) ubicados en la membrana plasmática de los pelos radicales, gatillando una serie de eventos moleculares, entre los que se encuentran la producción finamente regulada de especies activas del oxígeno (EAO), oscilación de concentraciones de calcio y activación de proteínas kinasas, que sustentan el reconocimiento temprano (Gage, 2004; Cárdenas et al., 2008; Muñoz et al., 2012; Robert et al., 2018; Roy et al., 2020). La activación de esta cascada de señalización conduce a la activación de genes implicados en vías de señalización de nodulación (factores de transcripción NSP1/NSP2, NIN, entre otros) y nodulinas (proteínas específicas esenciales para el desarrollo y función de los nódulos, por ejemplo Enod40), y la represión de las respuestas de defensa (Fig. 1). Es así que los factores Nod son piezas claves en la determinación de la especificidad del rango hospedador.

Se sabe que de 2 a 5 minutos después de la percepción del simbionte, se inducen respuestas específicas tempranas en los pelos de la raíz, incluyendo la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de calcio, la señalización de fosfolípidos, la alcalinización intracelular y la generación de especies reactivas del oxígeno (EAO). Al respecto, Cárdenas et al. (2008) identificaron el complejo NADPH oxidasa de membrana plasmática como fuente de EAO intracelular durante esta etapa de la interacción simbiótica. Estos cambios redox inducidos por rizobios implican un pico de producción intracelular de EAO en el pelo radicular entre 2 y 5 min post-inoculación (Cardenas et al 2008; Muñoz et al., 2012) y una generación apoplástica sostenida de EAO (Muñoz et al., 2012). Posteriormente se observa el curvado del pelo radicular, cambio morfológico temprano y esencial requerido para el éxito de la interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios. Para que se produzca el curvado del pelo radicular, toda la maquinaria implicada en el crecimiento polar del pelo radical, particularmente el tráfico de vesículas y la producción de EAO por el complejo NADPH oxidasa, debe funcionar correctamente y en asociación con las respuestas generadas por la percepción de los factores Nod (Muñoz et al., 2012; Robert et al., 2018). Dada esta dependencia, la infección de las células epidérmicas ocurre a nivel de los pelos jóvenes, aquellos que están en activo crecimiento. En esta etapa, los rizobios se dividen e ingresan a través del denominado hilo de infección formado por la invaginación de la membrana plasmática de los pelos de la raíz, y se internalizan finalmente en las células de la corteza de la raíz de la planta por endocitosis (Fig. 1). Allí se diferencian y mantienen dentro de compartimientos membranosos específicos llamados simbiosomas. La formación del hilo de infección, el ingreso endocítico de la bacteria a las células corticales, la formación del simbiosoma, la diferenciación de los bacteroides y la FBN dependen del tráfico de endomembranas y vías secretorias (Wang D. et al 2010; Limpens E; et al 2009). En este sentido, Robert et al. (2018) demostraron el papel de PI3K, quinasa de lípidos implicada en el tráfico de vesículas y autofagia, en la modulación estricta de EAO en el pelo radicular requerida para el reconocimiento del microsimbionte por la planta.

En las interacciones compatibles, la fina regulación de las respuestas de defensa, las cuales tienen que suprimirse o morigerarse, permite el establecimiento de la simbiosis (Gourion et al., 2015; Miwa and Okazaki, 2017; Zipfel and Oldroyd, 2017) (Fig. 1); mientras que, en las interacciones incompatibles, la percepción del rizobio dispara una fuerte respuesta inmune en la planta que impide el establecimiento de la simbiosis (Sugawara et al., 2018; Shine et al., 2019). En la raíz, luego de la percepción del rizobio, se observan cambios tempranos a nivel transcripcional (30 min a 4 h) o más tardíos (24-72 h) de componentes moleculares involucrados en la simbiosis, pero también en la defensa (Muñoz et al., 2014; Estrada-Navarrete et al., 2016; Robert et al., 2018); mientras que los cambios transcripcionales asociados a la señalización derivada de la parte aérea, por su naturaleza sistémica, se observan más tardíamente (Sugawara et al., 2018; Shine et al., 2019; Okuma et al., 2020; Zhang et al., 2021).

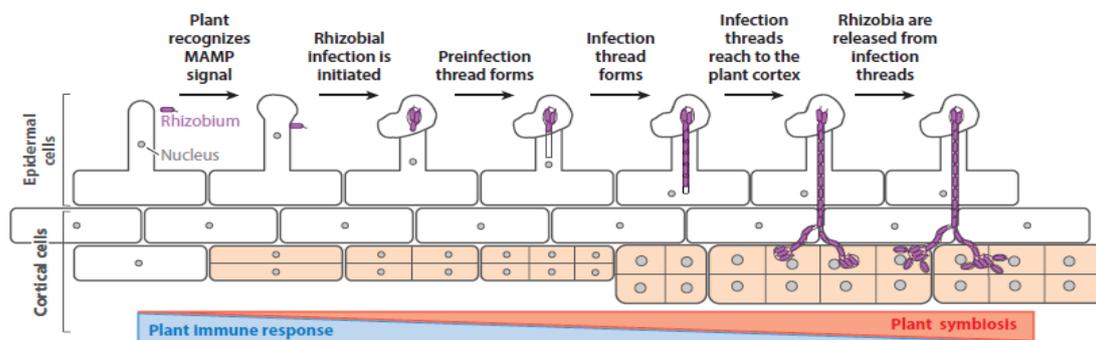


Fig. 1: Extraído de Pfeilmeier, (2017). Imagen representativa del ingreso de los rizobios a la raíz de la planta huésped. En la figura se aprecia cómo, al entrar en contacto con los pelos radiculares, los rizobios se internalizan en las células epidermicas a través del hilo de infección, y luego en las células corticales, siempre rodeados por membranas. La infección y nodulación son facilitados por la disminución en la respuesta inmune de la planta.

Por su parte, los efectores de rizobios, reconocidos por receptores intracelulares, comparten similitudes con efectores patogénicos, pero también otros son específicos de rizobios (Roy et al., 2020). A pesar de que se sabe poco acerca de sus funciones moleculares, la descarga de efectores a través del sistema de secreción, generalmente del tipo 3 (SST3), está involucrada en la eficiencia simbiótica y en la determinación del rango de hospedadores, es decir en la determinación de compatibilidad e incompatibilidad de genotipos (Yang et al., 2010; Miwa and Okazaki, 2017; Sugawara et al., 2018; Roy et al., 2020). Varios Nops (nodulation outer proteins) suprimen las reacciones de defensa de las plantas y por lo tanto promueven la simbiosis de los nódulos. Experimentos con rizobios mutantes para la vía de secreción de efectores demostraron la participación de los Nops intracelulares en la simbiosis leguminosa-rizobio. Esta mutación afectó la simbiosis de manera específica al hospedante. En algunos hospedantes, la presencia del SST3 no influye en la nodulación (*Vigna unguiculata*, *L. leucocephala*), en otros, la ausencia de un SST3 funcional tuvo un efecto beneficioso (*Pachyrhizus tuberosus*), mientras que en

un tercer grupo de hospedantes el SST3 es necesario para una simbiosis efectiva (*Tephrosia vogelii*) (Viprey V et al 1998).

La incompatibilidad específica de los genotipos (es decir que no se establece la nodulación) está controlada por una fuerte respuesta inmune denominada inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) que también involucra señales derivadas de la parte aérea, mayormente descripta en la interacción planta patógenos incompatible (Sugawara et al., 2018; Shine et al., 2019). Las funciones de virulencia de las proteínas efectoras del microorganismo son contrarrestadas por proteínas con secuencias repetidas ricas en leucina/sitio de unión de nucleótidos (NBS-LRR), una clase de proteínas R involucradas en la resistencia de las plantas contra patógenos microbianos, que activan las defensas durante la ETI. Recientemente se descubrió que los genes Rj2 y Rfg1 de soja son genes alélicos que codifican NBS-LRR (Yang, et al. 2010). El hecho de que soja Rj2 codifique una proteína TIR-NBS-LRR respalda el papel de componentes bacterianos secretados a través de T3SS en la incompatibilidad de nodulación específica del genotipo Rj del huésped. Sugawara, et al. (2018), usando mutantes naturales de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122 identificaron a NopP como el determinante de la incompatibilidad simbiótica con soja Rj2. Observaron también que al inactivar el sistema de secreción tipo 3 de USDA 122 se reestablece la capacidad de nodulación en un cultivar de soja genotipo Rj2. Al comparar entre los diferentes residuos de aminoácidos de NopP de la cepa incompatible (USDA 122) y una cepa compatible (USDA 110) vieron que se requiere cambios en sólo tres residuos de aminoácidos (R60, R67 y H173) para inducir la incompatibilidad simbiótica.

Al utilizar la restricción de nodulación del huésped, determinada por los genotipos Rj, las cepas de *Bradyrhizobium* autóctonas de un campo de soja en Japón se clasificaron en tres tipos de nodulación A, B y C (Ishizuka et al. 1991). Las cepas que eran compatibles con cualquier genotipo Rj se clasificaron como tipo de nodulación A, mientras que las cepas incompatibles con los cultivares Rj2, Rj3 se clasificaron como tipo B, y las cepas incompatibles con los cultivares Rj4 se clasificaron como tipo C. En esta Tesina, se utilizaron genotipos que permiten el establecimiento de la simbiosis (genotipos compatibles): *Bradyrhizobium diazoefficiens*, cepa USDA110, perteneciente al tipo A, y la cepa incompatible USDA122, perteneciente al tipo B. Se utilizaron plantas de soja (*Glycine max*) cv L76-1988, variante natural que presenta el gen dominante Rj2.

Respuestas sistémicas en la interacción leguminosa-rizobio

El número de nódulos está regulado a través de un mecanismo sistémico relacionado con la inmunidad innata denominado autorregulación de la nodulación (AON) (Ferguson et al., 2018; Roy et al., 2020). Este mecanismo involucra, entre otros, la síntesis a nivel de raíz de péptidos CLE, los cuales son transportados por xilema y percibidos por un complejo receptor quinasa rico en leucina en las células de la vasculatura foliar (denominado NARK en plantas *Glycine max*) (Ferguson et al., 2018). La percepción de los péptidos CLE da como resultado la regulación diferencial de una nueva señal derivada de la parte aérea que viaja de regreso a las raíces para regular el número de nódulos. Actualmente se conoce que los niveles del micro ARN 2111 (miR2111) están involucrados en la AON (Zhang et al., 2020). El miR2111 es

transportado a través del floema a la raíz, donde dirige la degradación del ARNm de un regulador negativo de la nodulación denominado Too Much Love (TML), (Zhang et al., 2020). TML es una proteína F-Box de localización nuclear que contiene repeticiones Kelch (Takahara et al., 2013), la cual se une específicamente a sus sustratos proteicos para su degradación a través del sistema proteosoma 26S (Ferguson et al., 2018). La percepción sistémica de los péptidos CLE inducidos por rizobios suprime la expresión de miR2111, lo que resulta en la acumulación de TML en las raíces y la subsiguiente inhibición frecuente de la organogénesis de los nódulos. Zhang et al. (2020) demostraron que aumentar la disponibilidad de miR2111 por sobreexpresión promueve la nodulación.

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo demostraron la ocurrencia de una señalización redox sistémica en plantas de soja en respuesta a la inoculación radical con *B. diazoefficiens* USDA110 (Fernandez-Göbel et al., 2019). Luego de 30 min de la inoculación de la raíz se observó un pico transitorio de generación de EAO en las hojas, acompañada de cambios en el estado redox del glutatión y activación de enzimas antioxidantes. Además, el pico de EAO y la activación sistémica de enzimas antioxidantes fueron abolidos por la adición, tanto en la raíz como en la hoja, de DPI, un inhibidor del complejo NADPH oxidasa, que genera anión superóxido en el apoplasto. La activación de la señalización redox sistémica se correlacionó con la inducción de tolerancia al estrés fotooxidativo. Asimismo, estos cambios redox sistémicos dependen de la señalización gatillada por receptores de factores Nod, ya que no se observó inducción sistémica de EAO en plantas mutantes *nfr5* no nodulantes, mientras que la mutante *nark* mostró una señalización redox sistémica similar a las plantas de tipo silvestre. Sin embargo, ni la mutante *nfr5* ni la *nark* mostraron tolerancia aumentada a la condición de estrés fotooxidativo comparado con el control (Fernandez-Göbel et al., 2019). Estos resultados sugieren que la señalización redox sistémica temprana durante la interacción simbiótica, depende del receptor de factor Nod, y que la respuesta de tolerancia inducida similar a una respuesta de *priming*, depende de los mecanismos AON.

Estas señales sistémicas y muchos otros factores que actúan en el control del número de nódulos son actualmente poco comprendidos. En resumen, las leguminosas han desarrollado una serie de vías moleculares -tanto a nivel local como sistémico- mediante las cuales se selecciona al hospedante y controla la nodulación, desde etapas iniciales, tales como la percepción bacteriana y el proceso de infección, hasta etapas tardías que incluyen el desarrollo y mantenimiento de nódulos, la diferenciación de la bacteria a bacteroide y la FBN. Asimismo, la modulación de estas vías moleculares, las cuales también están asociadas a mecanismos de inmunidad y respuestas a estrés, podrían estar implicadas en los fenómenos de resistencia sistémica inducida (ISR).

Autofagia y simbiosis

Autofagia es una vía de tráfico de endomembranas conservada en eucariotas, finamente regulada por los denominados genes *Atg*, que media la degradación o reubicación de componentes citoplasmáticos, los cuales son secuestrados en una estructura de doble membrana llamada autofagosoma y transportados hacia la vacuola (Yoshimoto y Ohsumi, 2018). Originalmente caracterizada como proceso degradativo durante la senescencia foliar y en respuesta a condiciones deficientes de nutrientes,

incluido el N (condiciones necesarias para el establecimiento de la simbiosis), ahora es bien sabido que autofagia cumple un papel más amplio en la biología vegetal incluyendo el desarrollo, la tolerancia a estreses abióticos y la resistencia a estreses bióticos (Tang and Bassham, 2018; Wang et al., 2018). En términos generales, autofagia contribuye con el control de la homeodinámica celular mediante la degradación de componentes celulares superfluos o dañados, frecuentemente asociados a la producción exacerbada de EAO y alteración del estado redox. Este rol antioxidante de la autofagia resulta esencial para la tolerancia del organismo a las tensiones ambientales. Asimismo, resultados recientes del grupo indican que la producción de EAO modula la actividad autofágica, destacándose la íntima interconexión entre autofagia y el estado redox celular (Enet A., 2022; Bellis P. 2022).

Autofagia está mediada por más de 30 genes *Atg* (Barth et al., 2001; Klionsky et al., 2003; Kanki et al., 2009; Nakatogawa et al., 2009; Okamoto et al., 2009) (Fig. 2). Los eventos tempranos de inducción de la autofagia involucran una cascada de señalización, donde las kinasas AMPK y TOR tienen roles opuestos. Mientras AMPK participa en la inducción, la actividad TOR inhibe el proceso de autofagia (Liu & Bassham, 2010; Marshall & Vierstra, 2018; Su et al., 2020). En el proceso de nucleación de vesículas destacamos la participación de ATG9 que interviene en el reciclaje de membranas/vesículas hacia el autofagosoma en formación, y al complejo PI3K (kinasa de fosfoinosítido) implicado tanto en etapas de formación de los autofagosomas como su fusión a vacuola. Resulta importante destacar que estos complejos también cumplen funciones críticas en otras vías de tráfico de endomembranas, específicamente el tráfico de vesículas (Yamauchi S et al., 2019; Lee Y et al., 2008). El complejo PI3K contiene una subunidad catalítica, VPS34/PI3K, y diferentes subunidades que regulan su actividad relacionada con el tráfico de vesículas o la autofagia (Bassham et al., 2006). Entre ellas, ATG6 es necesaria para la nucleación de membranas actuando como andamio para la actividad de PI3K (Liu et al., 2005). En la formación del autofagosoma destacamos al sistema de conjugación de la proteína ATG8 con fosfatidil etanolamina (ATG8-PE), vía similar a la ubiquitina que opera durante la expansión de la membrana del autofagosoma y también en la selectividad del cargo (Klionsky, 2005; Thompson & Vierstra, 2005). ATG8 localiza en el citoplasma y su lipidación con PE favorece su translocación a la membrana de los autofagosomas. La conjugación de ATG8 con PE se inicia por la acción de ATG4, una cisteína proteasa que escinde el extremo C de ATG8 exponiendo los residuos de glicina, luego ATG7 activa la transferencia de ATG8 a la enzima ATG3 para formar finalmente ATG8-PE (Ichimura et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado la función de ATG8 como receptor de proteínas específicas, reclutándolas hacia el autofagosoma, dando lugar a lo que se denomina “autofagia selectiva” (Noda et al., 2008). La unión selectiva tiene lugar a través de motivos de unión a ATG8 “AIMs” conservados en distintas proteínas interactoras con ATG8 (Noda et al., 2010; Novak et al., 2010; Wang et al., 2017). Una vez fusionado al autofagosoma, ATG8 no se disocia, característica por la cual es ampliamente utilizado como marcador del proceso utilizando plantas transgénicas que expresan la fusión transcripcional GFP-ATG8 (Bassham, 2015). Además de los componentes ATG, evidencias más recientes han demostrado la participación de la maquinaria molecular del tráfico de endosomas en distintas etapas de

la autofagia, postulando la interacción entre estas vías de tráfico de endomembranas (Robert et al., 2021).

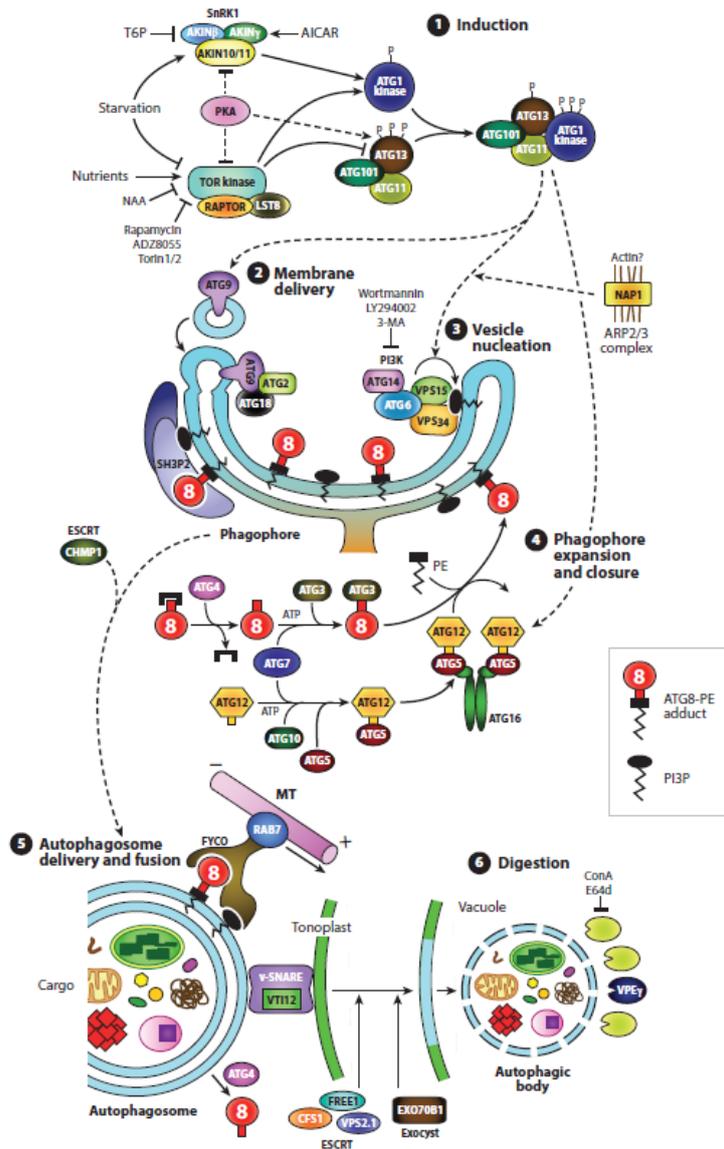


Fig. 2): Representación esquemática del proceso autofágico con sus distintas etapas, (1) Inducción dependiente del estado nutricional, y otros estreses, dada por TOR y su actividad sobre ATG13, (2) Transporte de lípidos para la formación del fagoforo mediada por ATG9, (3) Nucleación y (4) Expansión y cierre del fagoforo en donde destaca la asociación de ATG8 a fosfatidiletanolamina (PE) decorando las membranas interna y externa del autofosoma en expansión. (5) Transporte del autofosoma para su fusión al tonoplasto y (6) Digestión. Extraído de (Marshall & Vierstra, 2018).

Estudios más recientes han indicado que durante la interacción con patógenos, autofagia cumple funciones importantes en la inmunidad de las plantas, y diversos microorganismos han evolucionado formas de inhibir e incluso manipular el proceso de autofagia a través de la inyección de efectores (Leary et al., 2019). Teniendo en cuenta la conservación entre las bases moleculares que subyacen a las respuestas al simbiote y los patógenos (Miwa and Okazaki, 2017; Zipfel and Oldroyd, 2017) nos preguntamos si ¿podrían los efectores del rizobio modular la autofagia en la planta? ¿Autofagia cumple un rol en la incompatibilidad específica de los genotipos? Asimismo, tal como destacamos anteriormente, una vez que las bacterias ingresan a las células epidérmicas de la raíz, luego a las células del cortex y en el nódulo establecido, los rizobios están envueltos en membrana derivada de la planta, por lo que el estudio de la función del tráfico de endomembranas durante las interacciones simbióticas ha atraído mucha

atención (Roy et al., 2020). No obstante, aún se desconocen las implicancias de la autofagia en el desarrollo y establecimiento de los nódulos. Mediante el uso de raíces transgénicas con silenciamiento génico de diversos genes *Atg*, estudios recientes sumaron evidencias sugiriendo la participación de autofagia durante la interacción simbiótica (compatible) leguminosa-rizobio (Estrada-Navarrete et al., 2016; Robert et al., 2018). Sin embargo, aún no están dilucidadas cuáles son las funciones biológicas de autofagia durante el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis (Thanthrige et al., 2021). En esta tesina, mediante herramientas de genómica funcional, bioinformática y biología molecular, se plantea profundizar en el estudio de las funciones del proceso de autofagia, a nivel local y sistémico, en las interacciones compatibles e incompatibles leguminosa-rizobio. Los resultados de esta tesina aportarán conocimientos valiosos sobre un aspecto del proceso de autofagia poco explorado: su participación en la interacción leguminosa-rizobio y la FBN.

HIPÓTESIS

La autofagia, y sus funciones asociadas a la inmunidad y tráfico de membranas, participa en las respuestas locales y sistémicas inducidas durante la interacción simbiótica de *Glycine max* y *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la modulación local y sistémica del proceso de autofagia durante la interacción simbiótica compatible e incompatible de *Glycine max* y *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Objetivos específicos

1. Generar raíces transgénicas con expresión constitutiva de la construcción GFP-ATG8 en plantas de *Glycine max* para estudiar la participación de la autofagia en diferentes etapas de la interacción leguminosa-rizobio.
2. Estudiar la producción de EAO local y sistémica en interacciones compatibles e incompatibles entre *G. max* y *B. diazoefficiens*.
3. Estudiar la regulación local y sistémica de la autofagia durante la interacción compatible de *G. max* y *B. diazoefficiens* USDA110 e incompatible de *G max* y *B. diazoefficiens* USDA122.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *Glycine max* cv L-76 1988 para los tratamientos de inoculación con la cepa compatible *B. diazoefficiens* USDA 110 como para con la cepa incompatible *B. diazoefficiens* USDA 122 y tratamientos control sin inocular. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2%, a partir de una solución comercial de 60 g/L, en agitación constante por 10 minutos, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril. Luego las semillas fueron ordenadas en recipientes herméticos con tapa, conteniendo algodón y papel secante con saturación de humedad. La disposición de las semillas se realizó de modo que el hilio quede orientado en un mismo sentido con la finalidad de obtener una germinación similar entre ellas. Los recipientes cerrados se llevaron a una estufa de crecimiento a 28° C en oscuridad por 2 días. Las semillas con una radícula de 4 cm de largo fueron transferidas a macetas de 4 L conteniendo medio nutritivo ByD (1/2 X) (Broughton and Dilworth, 1971) adicionado con 1 mM de KNO₃ (0,404 g/L KNO₃) con el fin de favorecer la nodulación de la cepa compatible. Los cultivos hidropónicos fueron oxigenados mediante burbujeo de aire impulsado con una bomba con un caudal de 1,5 L/min. aproximadamente, a fin reducir la generación de óxido nítrico (NO) que se produce en anoxia y que inhibe la nodulación. Las macetas con las hidroponías se mantuvieron en una cámara de cría de plantas a 25 °C y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 h de oscuridad con una intensidad lumínica de 500 µmol/m²/seg-1 durante 12 días antes de ser inoculadas.

Crecimiento de cepas en medio solido

Las rizobacterias USDA 110 y USDA 122 pertenecientes a la colección del grupo de trabajo, y mantenidas stock a -80 °C, fueron crecidas en placas de Petri con medio selectivo LMA (Levadura Manitol Agar) solido estéril con el antibiótico de selección kanamicina (Vincent, 1970) y manipuladas bajo campana de flujo laminar.

Crecimiento de rizobacterias en medio liquido

Para el ensayo de inoculación, una colonia individual crecida en medio solido LMA, se transfirió a un Erlenmeyer conteniendo 100 mL de medio LMC (Levadura Manitol Caldo) y posteriormente incubado a 25 °C en un agitador orbital a 175 rpm durante 5 días y transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro a 600 nm. Se consideró adecuado una DO₆₀₀ entre 0,3 – 0,8. Los cultivos se centrifugaron en tubos de 250 mL a 568 G durante 40 min a 4 °C usando una centrifuga Beckman coulter y rotor de ángulo fijo JA 14. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 200ml de agua destilada estéril.

Inoculación del material vegetal

Plantas de *Glycine max* cv L-76, crecidas durante 12 días en hidroponía con medio ByD se inocularon con 200 mL de la suspensión de rizobacterias de la cepa compatible USDA 110, con igual volumen de la cepa incompatible USDA 122 y se mantuvo un

control no inoculado agregando 200 mL de agua destilada. En los días 2 y 6 post inoculación se muestreó por duplicado, la primer hoja trifoliada y la raíz de cada tratamiento. El material se transfirió a nitrógeno líquido, y se conservó a -80 °C en sobres de aluminio identificados hasta su procesamiento. Dos plantas de cada tratamiento se mantuvieron en cámara de crecimiento para evaluar la formación de nódulos en la interacción compatible y ausencia de estos en la interacción incompatible y en el control no inoculado. A los 20 días se cosecharon y contaron los nódulos y se analizaron el área foliar y contenido de clorofila de la primera hoja trifoliada empleando el software Fiji/Image J (Wayne Rasband, NIH, USA) y el medidor de clorofilas (CL-01 Chlorophyll Meter, Hansatech) respectivamente.

Señalización redox en las interacciones leguminosa *G. max*-*B. diazoefficiens* compatibles e incompatibles

-Respuesta sistémica: Producción de radical superóxido en hojas.

Plantas de *Glycine max* L-76 de 12 días de edad crecidas en condiciones de hidroponía fueron inoculadas con cepa compatible, USDA 110 e incompatible USDA 122. La primera hoja trifoliada fue colectada a los 30 min post inoculación para ser utilizada en la determinación de generación de especies reactivas del oxígeno (EAO). Los niveles de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) fueron determinados histoquímicamente por tinciones con nitro-blue tetrazolium (NBT), el cual se reduce en reacción con $O_2^{\cdot-}$ generando el precipitado azul de formazán. Las hojas fueron incubadas en una solución de NBT 0.01% (p/v) en buffer K-Hepes 25 mM (pH 7.6) y mantenidas a 28°C en oscuridad por 2 h. Las hojas se sumergieron en alcohol 80% y se incubaron a 80 °C durante 15 min, para reducir el contenido de clorofilas y facilitar la observación de los precipitados azules. Las hojas fueron escaneadas, las imágenes a color fueron transformadas en imágenes 8-bit invertidas y el valor de intensidad de grises de las tinciones azules fue cuantificado utilizando el software ImageJ.

-Respuesta local: Producción de niveles de radical superóxido en raíces jóvenes.

Semillas de *Glycine max* cv L-76 fueron germinadas en recipientes herméticos durante 2 días. Cuando las radículas tenían aproximadamente 3 cm de longitud, se emplearon para determinar histoquímicamente la producción de $O_2^{\cdot-}$. Las radículas fueron sumergidas durante 30 min en una solución de NBT 0.01% (p/v) adicionada con USDA 110, USDA 122 o agua como control. Las raíces permanecieron en contacto con esta solución durante 30 min, y se tomaron registros fotográficos a 5,10 y 30 min de incubación. La reacción se detuvo enjuagando las raíces en agua. Las raíces fueron escaneadas, las imágenes a color fueron transformadas en imágenes 8-bit invertidas y el valor de intensidad de grises de las tinciones azules fue cuantificado utilizando el software ImageJ.

Análisis de expresión génica (RT-qPCR)

Las muestras de hoja y raíz de 2 y 6 días post inoculación de cada tratamiento fueron molidas usando un mortero y nitrógeno líquido, hasta conseguir un polvo homogéneo. Se siguió el protocolo para la extracción del ARNm utilizando Trizol y la síntesis del ADNc utilizando una polimerasa reversa (M-MLV). Mediante PCR en tiempo real (qPCR) se analizaron los niveles de transcritos de los genes relacionados a **autofagia (Atg), de defensa (PR), nodulinas y percepción temprana** de rizobios (Enod), de autoregulación de la nodulación (AON) y genes de referencia o housekeeping (Actina y *EIF α -1*). Se usaron los siguientes primers

Genes de Autofagia

Atg4a-b, Fw-5'GAC AAC ACT GGA TTC CAA GAG GAT 3'
Rv-5'ATG CCA GGG ATC AAC CAA ACT TGC3'
Atg8a, Fw-5'CCC CGT CTC AAC TCA ATT CCA TTC TC3'
Rv- 5'CTC CTT CAA GCT TGA ACA TCC CTT GG3'

Genes de defensa

PR1 Fw- 5' AAC TAT GCT CCC CCT GGC AAC TAT ATT G 3'
Rv-5'TCT GAA GTG GTA GCT TCT ACA TCG AAA CAA3'
PR2, Fw-5'TGA AAT AAG GGC CAC GAG TCC AAA TG3'
Rv- 5'ATG GTA CAT GCA GAC TTC AAG AAT GCA GAT3'

Gen de nodulina 40, *Enod40*, percepción temprana del rizobio

Fw-5'TCT CTC TTG AGT GGC AGA AGC A3'
Rv-5'TGG AGT CCA TTG CCT TTT CG3'

Sistema de autorregulación de la nodulación, AON

Mi2111, stem-loop qPCR CCG TTA ATC TGC ATC CTG A

Genes de referencia

Actina Fw-5'AAC GAC CTT AAT CTT CAT GCT GC 3'
Rv- 5'GGT AAC ATT GTG CTC AGT GGT GG3'
EIF α -1 Fw-5'GGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG 3'
Rv-5'GCA CCC AGG CAT ACT TGA ATG ACC3'

Se realizó un PCR en tiempo real. Los niveles de expresión de los genes de interés fueron estandarizados utilizando el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen 2001).

Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* con las construcciones para la expresión de GFP-ATG8 y silenciamiento génico de *Atg4*, *Atg6* y *PI3K*.

Se utilizó el plásmido pMDC43 para la generación de la fusión transcripcional GFP-ATG8, y el plásmido pK7GWIWG2D (II) para el silenciamiento post-transcripcional. Se amplificaron por PCR secuencias cortas conservadas de los genes *GmPI3K*, *GmAtg6* y *GmAtg4* (para silenciamiento), y la secuencia completa de *AtAtg8* (para expresión). Estos amplicones fueron introducidos en el vector de entrada pENTR

(Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se realizó la recombinación a los vectores destino mencionados anteriormente. La recombinación en los vectores se revisó mediante crecimiento en selección con antibióticos, análisis de restricción con diferentes enzimas y secuenciación.

Una vez obtenidos los plásmidos se realizó la transformación química de bacterias *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599). Se agregó 1 µl del plásmido purificado a 50 µl de un cultivo de *A. rhizogenes* quimio-competente y se aplicó un shock térmico, incubándolas a 42 °C por 2 minutos, seguido de una recuperación con medio SOC a 25 °C en agitación suave. Las bacterias se cultivaron en 100 ml de medio LB con 100 µl de kanamicina como agente de selección, se incubaron a 28 °C y a las 48 h se identificaron colonias positivas mediante PCR de colonias.

Obtención de raíces en cabellera (*hairy roots*)

Para la generación de raíces en cabellera o *hairy roots* se utilizaron semillas de soja cv Bragg, germinadas como se describió anteriormente. Una vez emergida la radícula se descartó el embrión usando un bisturí con el que además se generó un corte en los cotiledones. En el sitio de corte de los cotiledones se infectó con los *A. rhizogenes* transformadas (descrito en el punto anterior) usando una jeringa con aguja, tipo tuberculina. Los cotiledones infectados fueron colocados en placas de Petri conteniendo agar agua 1,5 %. Las placas se sellaron con film plástico y se incubaron en cámara de cría a 25 °C con un fotoperiodo de 18 h de luz y 6 h de oscuridad. Las *hairy roots* desarrolladas se observaron con lupa de fluorescencia y se clasificaron como positivas para el silenciamiento de los genes *atg6*, *atg4*, *GUS* y *PI3K* las que contenían la proteína reportera GFP (fluorescentes bajo luz UV) y como negativas a aquellas no fluorescentes. Esto se realizó mediante microscopia. Resulta importante destacar que trabajos previos del grupo demostraron que las raíces fluorescentes tienen mayores niveles de silenciamiento del gen target que las raíces no verdes (Robert *et al.*, 2018). Hasta el momento, no hemos obtenido eventos positivos con la construcción pMDC43/GFP-ATG8.

Los pelos de las *hairy roots* se observaron en lupa (10X), se fotografiaron y caracterizaron según su longitud en las diversas transformaciones usando el software ImageJ.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos implicaron análisis de la varianza y test DGC, utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*).

RESULTADOS

Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de las implicancias de la autofagia en la interacción leguminosa-rizobio

Obtención de raíces transgénicas GFP-Atg8

Ha sido demostrado que la autofagia cumple roles en las interacciones planta-microorganismo en parte debido a sus implicancias en la inmunidad de las plantas. Por ejemplo, se ha demostrado su participación en la degradación selectiva de patógenos intracelulares (xenofagia) y efectores bacterianos (efectorfagia) (Dagdas et al., 2016; Lal et al., 2020; Leong y Langin, 2022). Más recientemente, diferentes trabajos publicados han sugerido indirectamente la participación de la autofagia durante el establecimiento de la interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios (Robert et al., 2014b; Estrada-Navarrete et al., 2016; Nanjareddy et al., 2016a; Robert et al., 2018; García-Soto et al., 2024). Mediante el uso de enfoques farmacológicos y genéticos se demostró que el complejo PI3K juega roles importantes a lo largo del proceso simbiótico entre leguminosas y rizobios (Peleg-Grossman et al., 2007; Estrada-Navarrete et al., 2016; Robert et al., 2018). Sin embargo, considerando que el complejo PI3K participa en la modulación de la producción de EAO y el tráfico de vesículas, dos procesos esenciales para el establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rizobios (Peleg-Grossman et al., 2007; Robert et al., 2018), aún no existe evidencia directa para confirmar si la autofagia está involucrada en las interacciones simbióticas, como se discutió recientemente (Tang y Bassham, 2018; Thantrige et al., 2021). En este sentido, uno de los objetivos de esta Tesina fue obtener raíces transgénicas que expresen la construcción GFP-ATG8 de manera constitutiva. Esta herramienta permite monitorear, además del fenotipo de nodulación en plantas sobreexpresoras, la formación de autofagosomas en respuesta a la inoculación con rizobios compatibles e incompatibles, analizar la ubicación subcelular de la construcción GFP-ATG8 durante el establecimiento de la simbiosis y el desarrollo nodular, y mediante experimentos de co-inmunoprecipitación, analizar interactores de ATG8 a lo largo del proceso de infección y desarrollo nodular.

La construcción para la generación de la fusión transcripcional GFP-ATG8 fue introducida en la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* mediante transformación química (detalles en *materiales y métodos*). Una vez obtenido el plásmido y las bacterias transformadas, se procedió a aislar las mismas con el método de estriado en medio de cultivo con kanamicina como antibiótico de selección. Se aislaron un total de 12 colonias, de las cuales se realizaron stocks y se volvieron a crecer en medio con selección. Finalmente, cotiledones de plántulas germinadas 48 h en oscuridad a 27 °C se infectaron con las distintas colonias, y se incubaron en placas de Petri con agar agua (Fig. 3B). De las 12 colonias aisladas solo las colonias número 7 y 12 generaron raíces en cabellera, pero en ninguna de ellas se pudo observar fluorescencia de GFP. Hasta el momento no hemos logrado obtener raíces transgénicas fluorescentes.

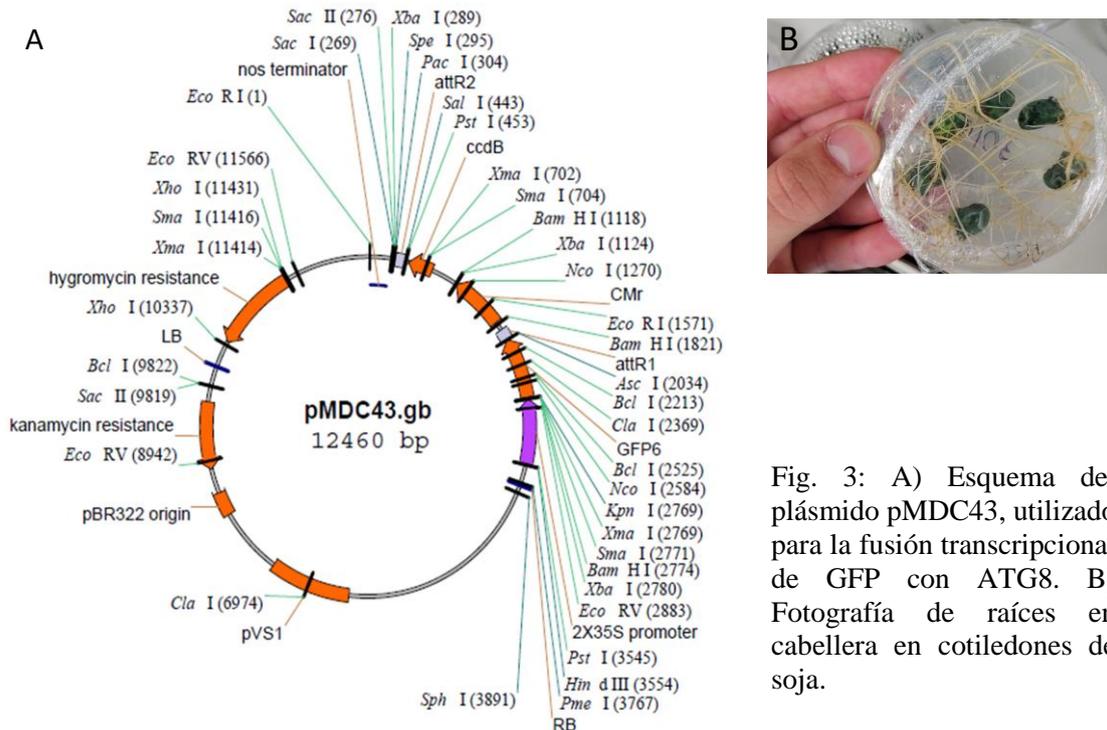


Fig. 3: A) Esquema del plásmido pMDC43, utilizado para la fusión transcripcional de GFP con ATG8. B) Fotografía de raíces en cabellera en cotiledones de soja.

Análisis de dominios de interacción a ATG8 y PI3P en efectores de *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

La translocación de los efectores Nops de rizobios en el citosol de la célula hospedadora es un proceso crítico para el reconocimiento, la especificidad del hospedador y la regulación de la nodulación (Gourion et al., 2015; Sugawara et al., 2018). Aunque se sabe poco sobre sus roles moleculares, los efectores microbianos están involucrados en la determinación del rango de hospedadores y la eficiencia simbiótica al modular las respuestas de defensa de la planta, teniendo efectos positivos o negativos en el proceso de nodulación (López-Baena et al., 2009; Okazaki et al., 2013; Gourion et al., 2015; Sugawara et al., 2018). De manera similar, los microorganismos patogénicos inyectan efectores que son reconocidos intracelularmente, y se ha demostrado recientemente que algunos de ellos interactúan con ATG8 a través de los dominios AIMs. Además, se ha postulado que la presencia de PI3P, el producto de la actividad del complejo PI3K, en la superficie externa de la membrana plasmática de células de soja, puede mediar la entrada de efectores microbianos en las células vegetales (Kale et al., 2010). El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de 38 efectores Nops de *Bradyrhizobium diazoefficiens* nos permitió identificar dominios putativos de interacción con Atg8 (Atg8-interacting motifs, AIM) definidos por las secuencias degeneradas de consenso F/W/Y-X-X-L/I/V como así también dominios de interacción a PI3P (Tabla 2) (Noda et al., 2008). La predicción del dominio AIM se realizó con el enfoque bioinformático de alta fidelidad AIM (hfAIM) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/hfAIM/>), que utiliza requisitos adicionales de secuencia como la presencia de aminoácidos ácidos y la ausencia de aminoácidos positivamente cargados cerca del dominio AIM (Xie et al., 2016).

Effector	NCBI protein accession	Description	hfAIM	RxLR motif
NopAC	WP_011084793	Glycosyl hydrolase family protein	ND	RLLR [36,39]
NopAE	WP_011088947	Methanol/ethanol family PQQ-dependent dehydrogenase	PFDYDSV* [296,302]	ND
bll1848	BAC47113	bll1848	DRVYDDV* [109,115]	ND
NopAR	WP_011084646	Hypothetical protein	EWDFLPV* [600,606] LGEWDFL* [598,604]	RRLR [85,88]
NopAU	WP_011089560	MHS family MFS transporter	TPVFEDI* [224,230]	ND
NopAV	WP_011089559	Carboxylesterase family protein	EDPYEAL* [343,349]	ND
blr0077	BAC45342	blr0077	KKLFDEL* [411,417]	ND
NopBM	WP_011089955	XRE family transcriptional regulator	ND	RQLR [12,15]
NopBO	WP_011089953	Hypothetical protein	ND	RILR [178,181]
NopM1	WP_011084490	Hypothetical protein	WKPWDDV* [534,540]	ND
NopV	WP_011084623	Type III secretion system stator protein SctL	FKDYDGL* [149,155]	ND
NopY	WP_011084612	Hypothetical protein	AEDFQPI* [101,107] SLEFEVL* [6,12]	ND

Tabla 1: Identificación de posibles dominios AIMs y dominios RXLR en los efectores de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Los números entre corchetes corresponden a la posición de aminoácidos de los patrones hfAIM o RXLR. ND, no se predijeron AIMs o RXLR.

Características morfológicas de los pelos radiculares en raíces en cabellera con silenciamiento post-transcripcional de genes *Atg*.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el silenciamiento de los genes *Atg4*, *PI3K* y *Atg6* generaba una marcada disminución en el número de nódulos. Sin embargo, es bien sabido que el complejo PI3K cumple otras funciones además de participar en la autofagia, las cuales están asociadas al tráfico de endosomas y la señalización redox (Robert et al., 2018), por lo que los mecanismos de inhibición de la nodulación en los diferentes genotipos podrían ser diferenciales. Dado que estas funciones del complejo PI3K resultan críticas para el crecimiento polar de los pelos radiculares (Lee et al., 2008; Robert et al., 2018), analizamos el crecimiento de estas células epidermales en los diferentes genotipos de raíces transgénicas. Se incluyó una construcción del vector con el gen que codifica a glucuronidasa (GUS) como control.

Las raíces en cabellera transgénicas obtenidas por infección con *A. rhizogenes* tienen la particularidad de que cada raíz es un evento transgénico independiente, teniendo cada una de ellas diferentes niveles de silenciamiento génico, y por lo tanto muestran variaciones en el fenotipo (Robert et al., 2018). Dado este resultado nos enfocamos en analizar las raíces en cabellera que mostraban una alta fluorescencia del gen reportero (GFP) (Fig. 4) y otras que no mostraban fluorescencia (nv; no verde). Los resultados obtenidos de este experimento señalan que las raíces con la inhibición génica de *Atg6* y *PI3K* presentan pelos de mayor longitud en comparación con aquellas que carecen de fluorescencia indicadora a diferencia de lo observado en el caso de *Atg4* (Fig.4). En

cuanto al silenciamiento de GUS utilizado como control, no se observaron disparidades en la longitud de los pelos entre las raíces pilosas que mostraban fluorescencia y las que no.

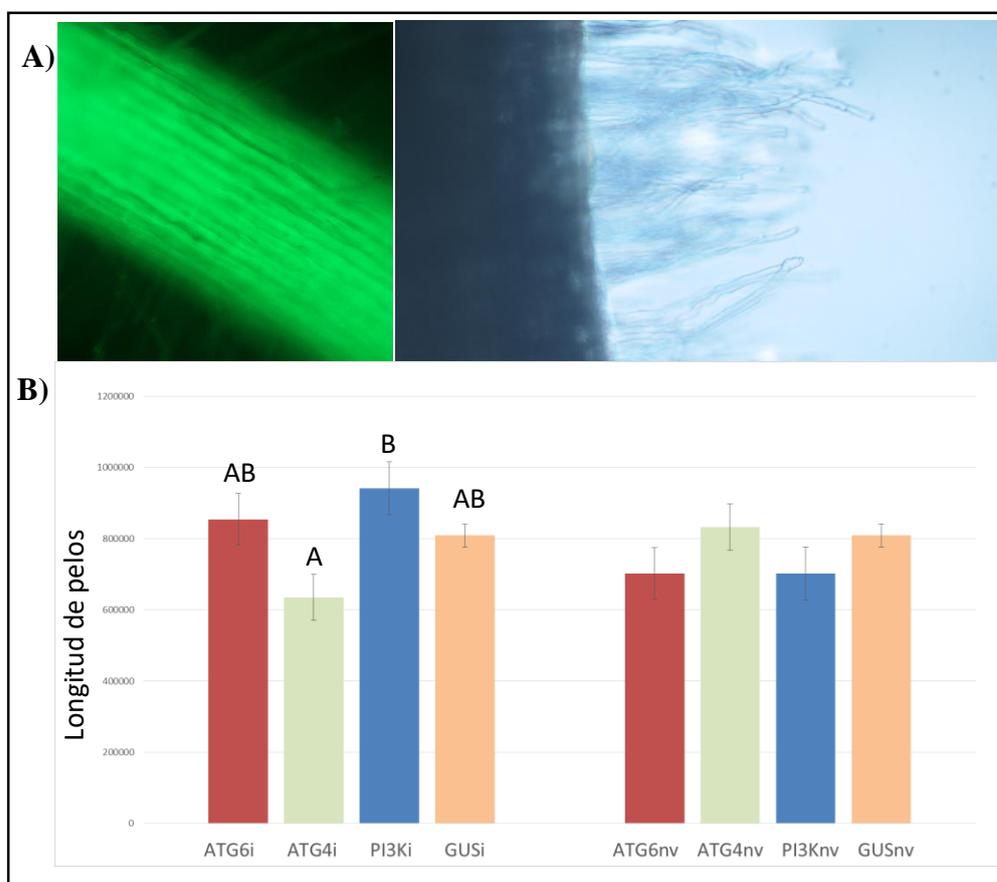


Fig. 4): Longitud de pelos ubicados en la región proximal de raíces en cabellera. (A) Imagen de raíz transgénica fluorescente y luz transmitida mostrando detalle de los pelos radicales. (B) Largo promedio de pelos radicales de raíces transgénicas fluorescentes con inhibición de los genes (izquierda) y no fluorescentes (derecha). Las letras diferentes representan diferencias significativas DGC valor $p > 0.05$. La longitud de los pelos fue determinada por la distancia en pixeles que el mismo programa ImageJ arroja.

Caracterización de la producción de EAO local y sistémica en interacciones compatibles e incompatibles entre *G. max* y *B. diazoefficiens*.

El aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (EAO) es también una respuesta de defensa común en plantas. Sin embargo, la cinética de generación, intensidad y localización son diferenciales y características de cada tipo de interacción planta-microorganismo (patogénica o simbiótica). En las interacciones simbióticas compatibles la respuesta redox asociada a la generación de EAO es crítica para el establecimiento de la simbiosis. En este sentido, trabajos de nuestro grupo demostraron la relevancia de la producción temprana de EAO a nivel local con la participación fundamental de los complejos NADPH oxidasa y PI3K a nivel de membrana plasmática y de endosomas (Muñoz et al., 2012; Muñoz et al., 2014; Robert et al., 2018). Más

recientemente, nuestro grupo caracterizó la producción temprana de EAO sistémicas en respuesta a la inoculación de plantas de soja con su rizobio compatible (Fernandez-Göbel et al., 2019). Asimismo, estudios realizados, con una cepa mutante de *S. meliloti*, simbionte de Medicago, que degrada H_2O_2 de manera muy eficiente, debido a la sobreexpresión de un gen de catalasa, muestra propiedades de infección alteradas e induce la formación de un número reducido de nódulos (Jamet, et al. 2007). Por su parte Andrio, et al. (2013) demostraron que más de 300 genes inducidos durante los pasos iniciales del proceso simbiótico son probablemente regulados por H_2O_2 en *M. truncatula*. Más allá de la infección, la producción de EAO por parte de la planta parece ser necesaria para una simbiosis óptima durante las últimas etapas del proceso simbiótico. Sin embargo, aún no hay reportes respecto a las respuestas redox asociadas al reconocimiento de rizobios que definen la incompatibilidad entre los genotipos.

En este trabajo, en las plantas de soja L-76 cultivadas en solución hidropónica durante 12 días, se aprecia que después de 30 minutos de la inoculación con las cepas USDA 110 y USDA 122, los niveles de radical superóxido aumentan en las primeras hojas trifoliadas en comparación con los niveles observados en las hojas de control. En la Figura 5, se evidencia el incremento en la producción sistémica de EAO en respuesta a la inoculación con el rizobio compatible USDA 110 respecto el control no inoculado. Las plantas inoculadas con el rizobio incompatible USDA122 también mostraron un incremento de EAO respecto el control, aunque de mayor intensidad respecto de lo observado con USDA110 (Fig. 5).

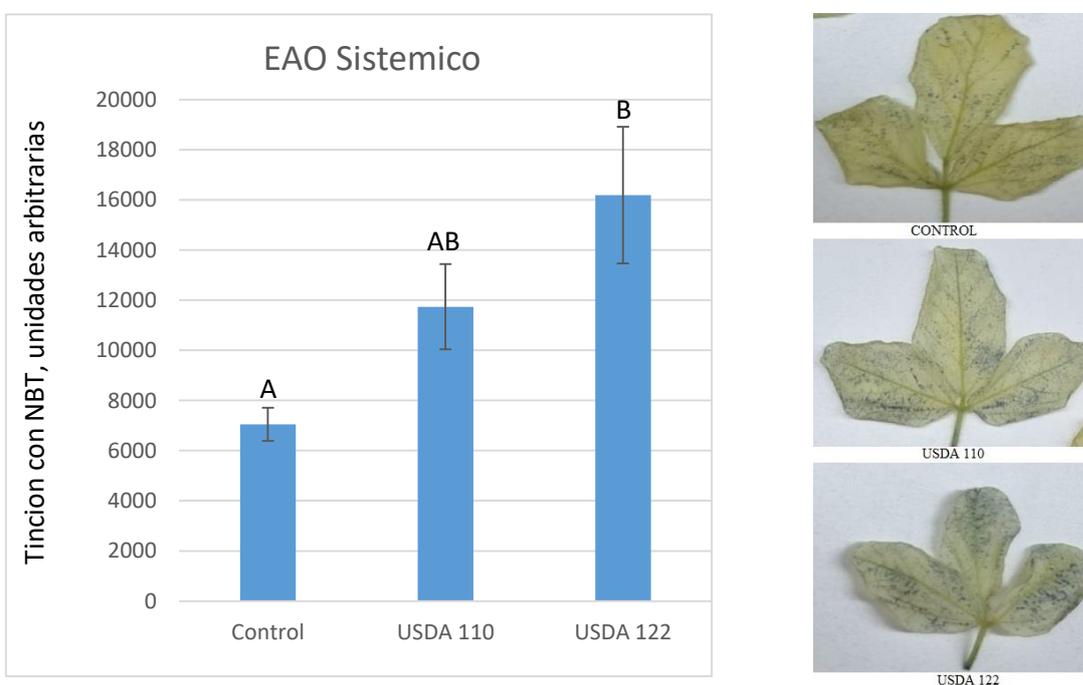


Fig. 5 Niveles de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la primera hoja trifoliada de soja L-76 de 12 días, luego de 30 min de inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA 110, USDA 122 y agua como control. Cuantificación de precipitado de NBT con software ImageJ. Las barras representan el promedio \pm EE. Letras diferentes representan diferencias significativas DGC valor $p > 0.05$

El análisis de la producción del anión O_2^- a nivel local se realizó de acuerdo con estudios previos del grupo (Muñoz et al., 2012; Robert et al., 2018). La inoculación de raíces de 48 h post germinación con el rizobio compatible USDA 110, promovió la producción de superóxido respecto al control (Fig. 6). Por su parte, la inoculación de las raíces con el rizobio incompatible USDA 122 no mostró diferencias en la producción de EAO respecto al control en los tiempos analizados (5, 10 y 30 min) (Fig. 6). Un aspecto llamativo es que se observó reacción de NBT en el medio de incubación de las raíces en presencia de la cepa compatible USDA 110, además de deposición del precipitado sobre las raíces, lo que indicaría mayores niveles de producción de radical superóxido en USDA 110 respecto de la cepa incompatible USDA 122 (Fig. 7). El número de rizobacterias estimado por DO_{600} fue similar en ambos tratamientos.

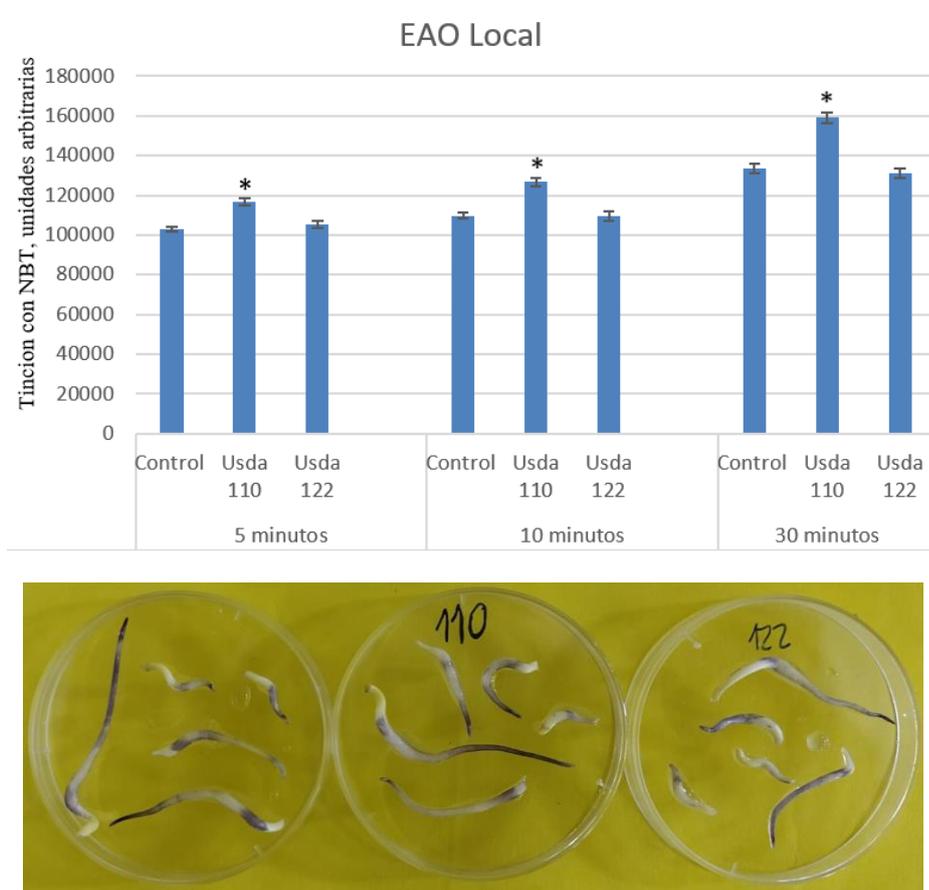


Fig. 6 Producción de radical superóxido en raíces de soja L-76 de 2 días inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA 110, USDA 122 y agua como control a 5, 10 y 30 min post inoculación. Cuantificación de azul de formazán usando el software ImageJ. Las barras del grafico representan el promedio \pm EE y los asteriscos representan diferencias significativas DGC valor $p > 0.05$.



Fig. 7 Producción de O_2' en el medio de incubación conteniendo *B. diazoefficiens* USDA 110, USDA 122 con raíces de soja L-76 luego de 30 min.

Modulación local y sistémica del proceso de autofagia y respuestas de defensa en interacciones compatibles e incompatibles.

Como se mencionó anteriormente, las herramientas disponibles para el monitoreo de autofagia implican principalmente el uso de plantas transgénicas (Bassham, 2015). No obstante, se ha reportado que la inducción de autofagia, particularmente en respuesta a condiciones de deficiencia nutricional y senescencia foliar, exhibe una fuerte regulación transcripcional (Yoshimoto et al., 2004; Bedu et al., 2021). Dados estos antecedentes, y debido a la dificultad de transformar plantas de soja, en esta Tesina analizamos al proceso de autofagia mediante el monitoreo de los niveles de expresión de genes *Atg* (*Atg8a* y *Atg4a-b*) por RT-qPCR. Además, se analizaron los niveles de expresión de los genes PR1 y PR2 como indicadores de respuesta de defensa (Sugawara et al., 2019; Muñoz et al., 2014). Los niveles de expresión de actina y del factor de elongación 1a (EIF1a) fueron utilizados como referencia (Robert et al., 2018; Muñoz et al., 2014; Estrada-Navarrete et al., 2016).

Plantas de soja L-76 de 12 días fueron inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA 110, USDA 122 o no inoculadas. A 2 y 6 días post-inoculación, se muestrearon raíces y la primera hoja trifoliada, se realizó la extracción de ARN y se analizó la expresión de los genes relativos al tratamiento control no inoculado. El patrón de expresión de los genes analizados en los distintos tratamientos fue similar comparando ambos genes de referencia actina y EIF1a (Tabla 2).

Dos plantas de cada tratamiento y para cada experimento se mantuvieron en cámara de crecimiento durante 20 días y sobre ese material se contaron nódulos y se determinó el contenido de clorofila (Fig. 8). Se observa un mayor verdor y un mayor área foliar de la segunda hoja trifoliada en plantas inoculadas con la cepa compatible (USDA110) en comparación con plantas inoculadas con la cepa incompatible (USDA 122) y el control, esto podría indicar un estado de desarrollo mayor en plantas inoculadas con el rizobio compatible. Confirmamos el éxito del experimento al observar la presencia de nódulos en plantas inoculadas con la cepa compatible y la ausencia de estos en el control y ante la inoculación con la cepa incompatible.

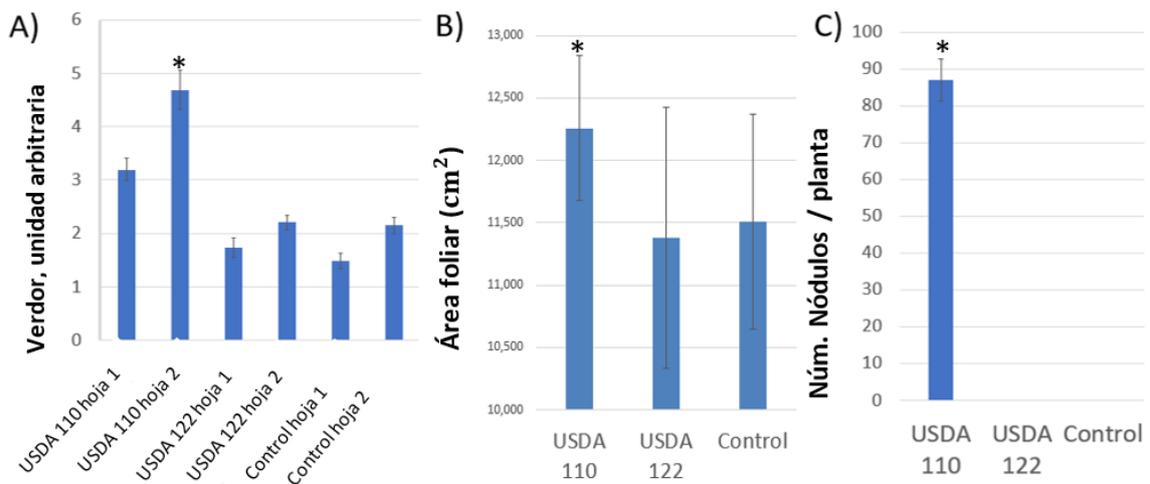


Fig. 8: (A) Contenido de clorofila en primera y segunda hoja trifoliada. (B) - Área del folíolo central de la segunda hoja trifoliada (C) - Número de nódulos. Determinaciones en plantas de soja L-76 20 días post inoculación con *B. diazoefficiens* USDA 110, USDA 122. Los asteriscos indican diferencias significativas DGC valor $p > 0.05$.

A				
Hojas				
	USDA 110		USDA 122	
	2 dpi	6 dpi	2 dpi	6 dpi
Atg8a	1,219	0,914	0,861	0,418
Atg4	0,514	0,929	1,188	0,366
PR1	0,376	1,875	0,480	0,618
PR2	1,394	0,560	0,787	0,222
Raíces				
	USDA 110		USDA 122	
	2 dpi	6 dpi	2 dpi	6 dpi
Atg8a	0,837	0,720	1,140	0,255
Atg4	1,671	1,002	1,938	0,035
PR1	1,057	1,150	0,793	0,316
PR2	0,536	0,907	0,505	0,496

B				
Hojas				
	USDA 110		USDA 122	
	2 dpi	6 dpi	2 dpi	6 dpi
Atg8a	2,663	0,724	0,857	0,589
Atg4	0,651	0,681	1,407	0,233
PR1	0,703	1,502	0,644	1,461
PR2	2,197	0,402	1,172	0,174
Raíces				
	USDA 110		USDA 122	
	2 dpi	6 dpi	2 dpi	6 dpi
Atg8a	0,752	0,652	0,729	0,400
Atg4	2,932	1,092	2,101	0,041
PR1	1,549	0,973	0,704	0,380
PR2	0,935	0,633	0,742	0,597

Tabla 2. Niveles de expresión por RT-qPCR de genes relacionados a la autofagia y de defensa en raíces y hojas de plantas de soja L-76 inoculadas con rizobios compatibles USDA110 e incompatibles USDA122 luego de 2 y 6 días post inoculación (dpi). A. Niveles de expresión

usando gen de Actina como referencia. B. Expresión usando el factor de elongación EIF1a como referencia. Los niveles de expresión de los genes *Atg8a*, *Atg4*; *PR1* y *PR2* fueron cuantificados mediante el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ y expresados relativos al control no inoculado. Los colores indican distintos niveles de expresión, yendo del rojo (mayor expresión) hacia el azul (menor expresión).

Los niveles de expresión del gen *Atg8a*, que codifica a proteína responsable entre otras funciones de decorar y contribuir al sellado del autofagosoma, disminuyeron a los 6 días post inoculación tanto en raíz como en hojas de plantas inoculadas con USDA 122, mientras que en raíces inoculadas con USDA 110 se mantuvieron prácticamente sin variaciones y disminuyeron levemente en hojas, entre las 2 y 6 h post inoculación (Fig. 9). Un patrón similar fue observado en la expresión del gen *Atg4a-b*. Los niveles de transcritos del gen *Atg4a-b* incrementaron en las raíces luego de 2 días de inoculación y cayeron a los 6 días. Este patrón fue más marcado en las plantas inoculadas con el rizobio incompatible USDA 122 (Fig. 9). En parte aérea, los transcritos de *Atg4a-b* cayeron luego de los 2 días post-inoculación con USDA 110, y se recuperaron a los 6 días; mientras que luego de la inoculación con el rizobio incompatible, los niveles de expresión se redujeron a los 6 días de tratamiento (Fig. 9). La disminución más marcada en la expresión de este gen se observa en la raíz de 6 días de las plantas inoculadas con USDA 122.

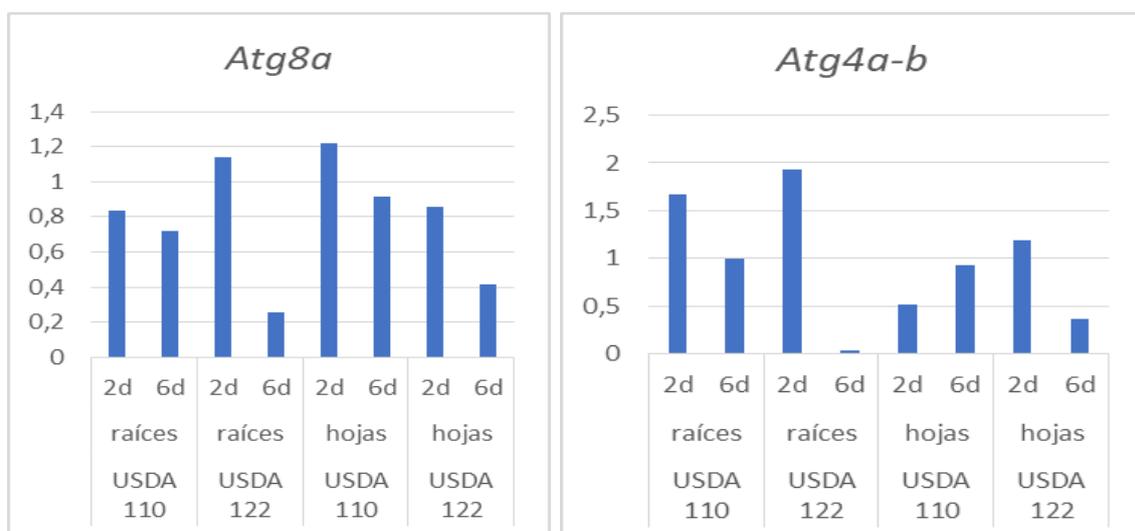


Fig. 9: Niveles de expresión de genes de autofagia *Atg8a* y *Atg4a-b* en muestras de hoja y raíces de soja L-76 2 y 6 días post-inoculación con *B. diazoefficiens* compatible USDA 110 y *B. diazoefficiens* incompatible USDA 122. Datos relativos al control no inoculado.

En términos generales, el análisis de expresión de genes de defensa muestra mayores niveles de mensajeros en las plantas inoculadas con la cepa compatible USDA 110 que con la incompatible en los tiempos analizados, tanto en raíces como en parte aérea (Fig. 10; Tabla 2). Los niveles de PR1 en raíces de plantas inoculadas con USDA 110 no variaron en los tiempos analizados respecto al control, y mermaron en plantas inoculadas con USDA 122 (Fig. 10). En la parte aérea, la inoculación con rizobio

compatible redujo la expresión de PR1 a los 2 días, pero incrementó a los 6 días (Fig. 10); mientras que sus niveles fueron menores al control en los dos tiempos analizados, en plantas inoculadas con rizobio incompatible (Fig. 10). La expresión de PR2 luego de la inoculación con USDA122, en términos generales, estuvo disminuida respecto al control, tanto a nivel local como sistémico (Fig. 10). Por su parte, la interacción con el rizobio compatible USDA 110 redujo los niveles de mensajero de PR2 en la raíz a los 2 días post-inoculación, mientras que incrementaron luego de 2 días en la parte aérea disminuyendo a los 6 días (Fig. 10). Desafortunadamente, no se obtuvieron amplificaciones para el análisis de expresión de los genes miR2111 y Enod40. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados utilizando secuencias previamente publicadas (Sugawara et al., 2019; Zhang et al., 2021)

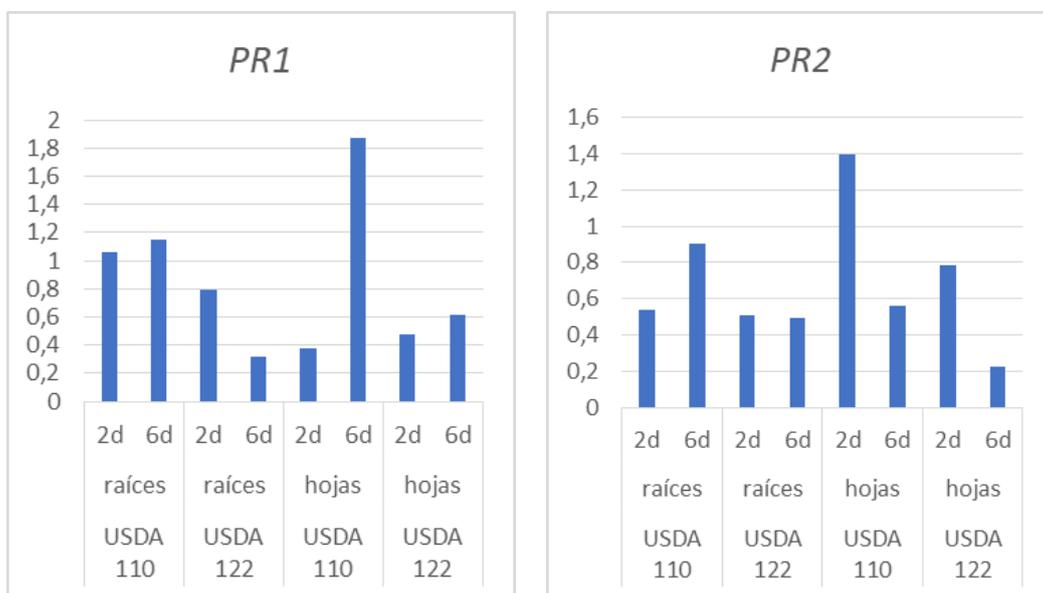


Fig. 10: Niveles de expresión de genes relacionados a la defensa PR1 y PR2 en hoja y raíces de soja L-76 a 2 y 6 días post-inoculación con *B. diazoefficiens* compatible, USDA11 e incompatible, USDA122. Datos relativos al control no inoculado.

DISCUSIÓN

El proceso de autofagia cumple una amplia gama de funciones celulares, con un fuerte impacto en la fisiología de los organismos. Este proceso está involucrado en muchos aspectos de la vida de las plantas, incluyendo la germinación, el establecimiento de las plántulas, el desarrollo, la reproducción, el metabolismo, la tolerancia al estrés y la muerte celular (Bassham, 2007; Yoshimoto, 2012). Más recientemente, autofagia ha sido implicada en la inmunidad de las plantas (Leary AY et al., 2019). Tal es su importancia, que en el año 2016 se otorgó el premio Nobel de Medicina-Fisiología al Dr. Yoshinori Ohsumi por sus estudios desarrollados en levadura que permitieron el descubrimiento de los mecanismos de autofagia, los cuales en la actualidad son insumo para avances innovadores en la salud humana (Levine y Klionsky, 2016), pero también para el mejoramiento de los cultivos, particularmente, pero no exclusivamente, por su rol en el uso eficiente del nitrógeno (Avin-Wittenberg T et al., 2018). En este sentido, uno de los objetivos de nuestro grupo es investigar las implicancias de la autofagia en la interacción leguminosa-rizobio, la FBN, y en las respuestas de resistencia sistémica inducidas durante la simbiosis. Enmarcada en este gran objetivo, en esta Tesina indagamos en la regulación transcripcional de autofagia local y sistémica durante la interacción leguminosa-rizobio tomando como modelo a la planta *Glycine max* L-76 y dos cepas de rizobios *Bradyrhizobium diazoefficiens*, USDA 110 que posee la capacidad de establecer una interacción compatible con la consecuente inducción de desarrollo de nódulos, y USDA 122 que dispara un mecanismo de defensa en la planta que impide la nodulación.

Una de las hipótesis que manejamos es que autofagia, dada su participación en las respuestas de inmunidad de las plantas, tendría un rol importante en las interacciones leguminosa-rizobio, tanto compatible como incompatible. Inicialmente, con el objetivo de investigar la modulación de autofagia en respuesta a la percepción de USDA 110 y USDA 122, se trabajó en la obtención de la construcción genética para la fusión transcripcional GFP-ATG8 bajo el control del promotor constitutivo 35S. Con esta herramienta podríamos analizar, además del fenotipo de nodulación en plantas sobreexpresoras, la formación de autofagosomas y actividad autofágica en respuesta a la inoculación con rizobios compatibles e incompatibles, analizar la ubicación subcelular de la construcción GFP-ATG8 durante el establecimiento de la simbiosis y el desarrollo nodular. Además, mediante experimentos de co-inmuno precipitación, sería posible analizar interactores de ATG8 a lo largo del proceso de infección, desarrollo nodular y durante la activación de la incompatibilidad. Luego de verificar el vector mediante la digestión con enzimas de restricción y secuenciación, para generar las transgénicas, se transformaron bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* para la transformación de hojas de tabaco por agroinfiltración de *A. tumefaciens* y la obtención de raíces transgénicas mediante la infección de cotiledones de soja con *A. rhizogenes*. Si bien los resultados de transformación transitoria en tabaco indicaron la expresión del vector, observándose autofagosomas y flujo autofágico, hasta el momento no hemos logrado obtener raíces en cabellera que expresen la construcción.

Parte de la contribución de la autofagia en las respuestas frente a patógenos implica el reconocimiento de moléculas efectoras (Leary et al., 2019). En este sentido, la traslocación de efectores de rizobios está involucrada en la determinación del rango de

hospedadores y la eficiencia simbiótica al modular las respuestas de defensa de la planta, incidiendo positiva o negativamente en el proceso de nodulación (López-Baena et al., 2009; Okazaki et al., 2013; Gourion et al., 2015; Sugawara et al., 2018). Los Nops, proteínas externas de nodulación, son efectores de rizobios que han sido caracterizados como proteínas secretadas por el SST3 o como componentes de este sistema secretor (Miwa y Okazaki, 2017). Además, se ha postulado que la presencia de PI3P, el producto de la actividad del complejo PI3K, en la superficie externa de la membrana plasmática de la soja puede mediar la entrada de efectores microbianos en las células vegetales (Kale et al., 2010). Mediante análisis *in silico*, en este trabajo se identificaron dominios putativos de interacción a ATG8 y al producto de la actividad del complejo PI3K, fosfatidil inositol-3 fosfato (PI3P). Estos resultados sugieren que la autofagia podría estar regulada por efectores o contribuir a las vías dirigidas por estos durante la interacción simbiótica, de manera similar a lo informado durante interacciones patogénicas (Leary et al., 2019). No obstante, estos motivos deben validarse mediante ensayos de unión de péptidos y evaluar sus efectos sobre autofagia para desentrañar cómo los simbioses interfieren y cooptan la vía de autofagia de las plantas.

El análisis de la señalización redox local y sistémica luego de la inoculación de raíces, evaluando la producción de EAO por histoquímica, mostró una respuesta diferencial en interacciones compatibles e incompatibles. A nivel sistémico, se observó un incremento de tinción con NBT en ambos tipos de interacciones, compatible e incompatible. Este resultado indica una mayor acumulación sistémica de EAO en respuesta a la percepción de los rizobios, particularmente luego de la inoculación con *B. diazoefficiens* incompatible USDA 122. Este resultado está en sintonía con trabajos previos que describieron un mayor incremento sistémico en la producción de EAO luego de 24 h de la percepción del rizobio incompatible, comparado con el rizobio compatible, asociado a la inmunidad activada por efectores (ETI) (Shine b et al., 2019).

A nivel local, la producción controlada de EAO contribuye al proceso de *curling* de los pelos radicales y a la activación de vías moleculares necesarias para el establecimiento de la interacción compatible, entre ellos la expresión de nodulinas tempranas (Muñoz et al., 2012; Ramu et al., 2002 Fonseca-García et al., 2019). La ausencia de señalización redox (¿o el secuestro de esta por parte del rizobio?) luego de la inoculación con la cepa USDA 122 sugiere que muy tempranamente se define la incompatibilidad, aún antes del aborto del proceso de infección reportado en estudios anteriores (Sugawara et al., 2018; Yasuda M et al., 2016). Dado que la incompatibilidad involucra la inducción de las defensas, similar a las respuestas de tipo ETI, resulta interesante evaluar la producción de EAO en una cinética más larga en el tiempo. No obstante, en el análisis de expresión de genes implicados en las respuestas de defensa no se observaron mayores niveles en las plantas inoculadas con el rizobio incompatible respecto aquellas inoculadas con USDA 110. Esto podría deberse a diferencias en el estado de desarrollo de las plantas analizadas en esta Tesina y lo reportado en la bibliografía. Estamos actualmente realizando experimentos con plantas de diferente edad.

Por otro lado, se observó una mayor tinción con NBT en el medio que contenía las bacterias compatibles que en el de las incompatibles. Resulta relevante estudiar a futuro las bases celulares/moleculares que subyacen a la producción diferencial de EAO

observadas entre los distintos rizobios ¿la tinción diferencial está dada por EAO generadas por la bacteria? ¿Depende de una actividad diferencial del sistema antioxidante de los rizobios? ¿Se observa esa diferencia entre USDA 110 y USDA 122 en ausencia de la planta?

Estudios previos de nuestro laboratorio y otros demostraron que el silenciamiento de los genes del complejo PI3K generaba una marcada disminución en el número de nódulos (Estrada-Navarrete et al., 2016; Robert et al., 2018). Sin embargo, es bien sabido que el complejo PI3K cumple otras funciones además de participar en la autofagia, las cuales están asociadas al tráfico de endosomas y la señalización redox (Robert et al., 2018). Con el objetivo de investigar la participación de autofagia en la interacción leguminosa-rizobio, analizamos la modulación transcripcional del proceso en respuesta a la inoculación. Si bien no es posible con este análisis determinar funciones de la autofagia en las interacciones compatibles e incompatibles, si se indica una modulación diferencial del proceso en respuesta a la inoculación con USDA 110 y USDA 122. En términos generales, se observa mayor reducción en respuesta a la percepción de USDA 122 que de USDA 110, comparado con el control no inoculado. Análisis más precisos de la actividad autofágica (tales como el análisis de formación de autofagosomas y flujo autofágico) son requeridos para completar este resultado. En este sentido, experimentos con raíces transgénicas con expresión de la construcción GFP-ATG8 aportarán resultados muy valiosos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LK and Murphy DV Eds 2003. Soil biological fertility: A key to sustainable land use in agriculture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Andrio, E., Marino, D., Marmeys, A., de Segonzac, M. D., Damiani, I., Genre, A., ... & Pauly, N. (2013). Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist*, 198(1), 179-189.
- Avin-Wittenberg T, Baluška F, Bozhkov P V., *et al.* 2018. Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *Journal of Experimental Botany* 69, 1335–1353.
- Barth, H., Meiling-Wesse, K., Epple, U. D., & Thumm, M. (2001). Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS letters*, 508(1), 23-28.
- Bassham, D. C. (2015). Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods*, 75, 181-188.
- Bedu M, Marmagne A, Masclaux-Daubresse C, Chardon F. 2020. Transcriptional Plasticity of Autophagy-Related Genes Correlates with the Genetic Response to Nitrate Starvation in *Arabidopsis Thaliana*. *Cells* 9, 1–19.
- Bellis, P. Participación del óxido nítrico en la regulación del proceso autofágico en plantas (Bachelor's thesis).
- Broughton, W. J., and Dilworth, M. J. (1971). Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochem. Journal* 125, 1075–1080.
- Cao, Y., Halane, M. K., Gassmann, W., & Stacey, G. (2017). The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annual review of plant biology*, 68, 535-561.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., & Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*, 56(5), 802-813.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves. F., Balzarini. M.G., Gonzalez. L., Tablada. M., Robledo. C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Enet Alejandro. 2022. REGULACION REDOX DE LA AUTOFAGIA EN PLANTAS. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Córdoba.
- Estrada-Navarrete, G., Cruz-Mireles, N., Lascano, R., Alvarado-Affantranger, X., Hernández-Barrera, A., Barraza, A., ... & Sanchez, F. (2016). An autophagy-related kinase is essential for the symbiotic relationship between

Phaseolus vulgaris and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 28(9), 2326-2341.

•Ferguson, S., Major, A. S., Sullivan, J. T., Bourke, S. D., Kelly, S. J., Perry, B. J., & Ronson, C. W. (2020). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NodD2 enhances competitive nodule colonization in the clover-rhizobium symbiosis. *Applied and environmental microbiology*, 86(18), e01268-20.

•Fernandez-Göbel, T. F., Deanna, R., Muñoz, N. B., Robert, G., Asurmendi, S., & Lascano, R. (2019). Redox systemic signaling and induced tolerance responses during soybean–*Bradyrhizobium japonicum* interaction: involvement of nod factor receptor and autoregulation of nodulation. *Frontiers in plant science*, 10, 141.

•Fonseca-García C, Zayas AE, Montiel J, Nava N, Sánchez F, Quinto C. 2019. Transcriptome analysis of the differential effect of the NADPH oxidase gene *RbohB* in *Phaseolus vulgaris* roots following *Rhizobium tropici* and *Rhizophagus irregularis* inoculation. *BMC Genomics* 20, 1–18.

•Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), 280-300.

•Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., & Stacey, G. (2015). Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*, 20(3), 186-194.

•Haxim, Y., Ismayil, A., Jia, Q., Wang, Y., Zheng, X., Chen, T., ... & Liu, Y. (2017). Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *Elife*, 6, e23897.

•Ibáñez, F., Tonelli, M. L., Muñoz, V., Figueredo, M. S., & Fabra, A. (2017). Bacterial endophytes of plants: diversity, invasion mechanisms and effects on the host. *Endophytes: Biology and Biotechnology: Volume 1*, 25-40.

•Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., ... & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488-492.

•Ishizuka, J., Suemasu, Y., & Mizogami, K. (1991). Preference of Rj-soybean cultivars for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation. *Soil science and plant nutrition*, 37(1), 15-21.

•Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A., & Hérouart, D. (2007). H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8741-8745.

•Kanki, T., Wang, K. E., Baba, M., Bartholomew, C. R., Lynch-Day, M. A., Du, Z., ... & Klionsky, D. J. (2009). A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20(22), 4730-4738.

- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., ... & Paglin, S. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), 151-175.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., ... & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5(4), 539-545.
- Leary, A. Y., Savage, Z., Tumtas, Y., & Bozkurt, T. O. (2019). Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 52, 46-53.
- Lee Y, Bak G, Choi Y, Chuang W-I, Cho H-T, Lee Y. 2008. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant physiology* 147, 624–635.
- Levine B, Klionsky DJ. 2016. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10–14.
- Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R. J., Bilgin, D. D., ... & Stacey, G. (2010). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant physiology*, 152(2), 541-552.
- Liu, Y., & Bassham, D. C. (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 5(7), e11883.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), 567-577.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annual review of plant biology*, 69, 173-208.
- Martos, F., Munoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C., & SELOSSE, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21(20), 5098-5109.
- Merkulova, E. A., Guiboileau, A., Naya, L., Masclaux-Daubresse, C., & Yoshimoto, K. (2014). Assessment and optimization of autophagy monitoring methods in *Arabidopsis* roots indicate direct fusion of autophagosomes with vacuoles. *Plant and Cell Physiology*, 55(4), 715-726.
- Miwa, H., & Okazaki, S. (2017). How effectors promote beneficial interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 148-154.
- Muñoz, N., Robert, G., Melchiorre, M., Racca, R., & Lascano, R. (2012). Saline and osmotic stress differentially affects apoplastic and intracellular reactive oxygen species production, curling and death of root hair during *Glycine max* L.–

Bradyrhizobium japonicum interaction. *Environmental and experimental botany*, 78, 76-83.

• Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(7), 458-467.

• Noda, N. N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010). Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1379-1385.

• Noda, T., Fujita, N., & Yoshimori, T. (2009). The late stages of autophagy: how does the end begin?. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), 984-990.

• Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., ... & Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports*, 11(1), 45-51.

• Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental cell*, 17(1), 87-97.

• Okuma, N., Soyano, T., Suzaki, T., & Kawaguchi, M. (2020). MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 11(1), 5192.

• Ramu SK, Peng HM, Cook DR. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 522–528.

• Raun, W. R., Johnson, G. V., & Westerman, R. L. (1999). Fertilizer nitrogen recovery in long-term continuous winter wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 63(3), 645-650.

• Robert, G., Muñoz, N., Alvarado-Affantranger, X., Saavedra, L., Davidenco, V., Rodríguez-Kessler, M., ... & Lascano, R. (2018). Phosphatidylinositol 3-kinase function at very early symbiont perception: a local nodulation control under stress conditions?. *Journal of experimental botany*, 69(8), 2037-2048.

• Robert, G., Yagy, M., Lascano, H. R., Masclaux-Daubresse, C., & Yoshimoto, K. (2021). A proposed role for endomembrane trafficking processes in regulating tonoplast content and vacuole dynamics under ammonium stress conditions in *Arabidopsis* root cells. *Plant Signaling & Behavior*, 16(9), 1924977.

• Roy, R., Reinders, A., Ward, J. M., & McDonald, T. R. (2020). Understanding transport processes in lichen, *Azolla*–cyanobacteria, ectomycorrhiza, endomycorrhiza, and rhizobia–legume symbiotic interactions. *F1000Research*, 9.

• Shine, M. B., Gao, Q. M., Chowda-Reddy, R. V., Singh, A. K., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Glycerol-3-phosphate mediates rhizobia-induced systemic signaling in soybean. *Nature communications*, 10(1), 5303.

- Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, *12*(8), e0182591.
- Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C., & Wang, P. (2020). Autophagy: an intracellular degradation pathway regulating plant survival and stress response. *Frontiers in plant science*, *11*, 164.
- Sugawara, M., Takahashi, S., Umehara, Y., Iwano, H., Tsurumaru, H., Otake, H., ... & Minamisawa, K. (2018). Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans via effector-triggered immunity. *Nature communications*, *9*(1), 3139.
- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., ... & Kawaguchi, M. (2013). Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume–Rhizobium symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, *54*(4), 433-447.
- Thantrige, N., Bhowmik, S. D., Ferguson, B. J., Kabbage, M., Mundree, S. G., & Williams, B. (2021). Potential biotechnological applications of autophagy for agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 760407.
- Thompson, A. R., & Vierstra, R. D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current opinion in plant biology*, *8*(2), 165-173.
- Tonelli, M. L., Figueredo, M. S., Rodríguez, J., Fabra, A., & Ibañez, F. (2020). Induced systemic resistance-like responses elicited by rhizobia. *Plant and Soil*, *448*, 1-14.
- Vera-Nunez, J. A., Infante-Santiago, J. P., Velasco, V. V., Garcia, S. S., Palma-Lopez, D. J., Grageda-Cabrera, O. A., ... & Pena-Cabriales, J. J. (2008). Influence of P fertilization on biological nitrogen fixation in herbaceous legumes grown in acid savannah soils from the Tabasco State, Mexico. *Journal of sustainable agriculture*, *31*(3), 25-42.
- Vincent. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, *1*(184), 99–105.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., & Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular microbiology*, *28*(6), 1381-1389.
- Yamauchi S, Mano S, Oikawa K, Hikino K, Teshima KM, Kimori Y. 2019. Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *116*, 19187–19192
- Yang, S., Tang, F., Gao, M., Krishnan, H. B., & Zhu, H. (2010). R gene-controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18735-18740.

• Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S. 2004. Processing of ATG8s , Ubiquitin-Like Proteins , and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy Published by: American Society of Plant Biologists (ASPB) Linked references are available on JSTOR for this article : The Plant cell 16, 2967–2983.

• Yoshimoto, K. (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant and Cell Physiology*, 53(8), 1355-1365.

• Yoshimoto, K., & Ohsumi, Y. (2018). Unveiling the molecular mechanisms of plant autophagy—from autophagosomes to vacuoles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 59(7), 1337-1344.

• Zhang, C., He, J., Dai, H., Wang, G., Zhang, X., Wang, C., ... & Wang, E. (2021). Discriminating symbiosis and immunity signals by receptor competition in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(16), e2023738118.

• Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7645), 328-336.