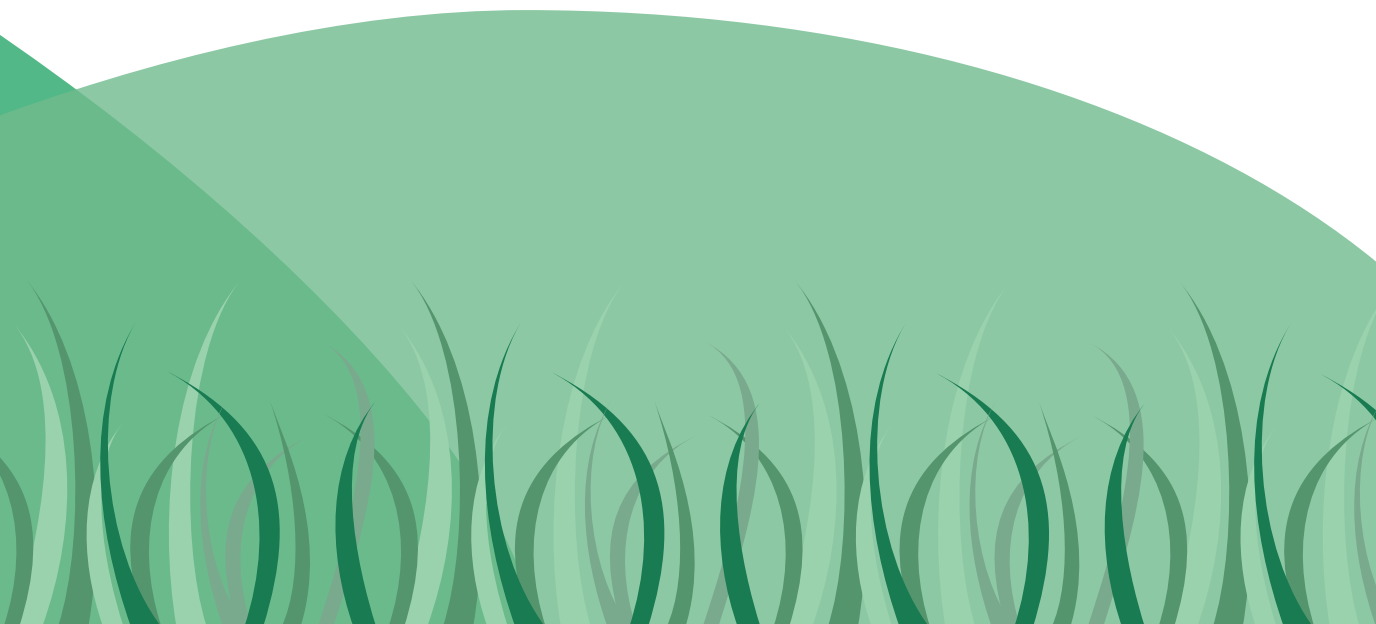




## **TESIS DOCTORAL**

# **Estudio del transporte y metabolismo del nitrógeno en micorrizas arbusculares**

Jacob Rafael Pérez Tienda  
Granada, 2012



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Jacob Rafael Pérez Tienda  
D.L.: GR 509-2013  
ISBN: 978-84-9028-388-2



Universidad de Granada  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio del transporte y metabolismo  
del nitrógeno en micorrizas arbusculares**

Memoria presentada por D. Jacob Rafael Pérez Tienda,  
Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor

Fdo.: **Jacob Rafael Pérez Tienda**

VºBº de las directoras de la Tesis Doctoral

Fdo.:

**D<sup>a</sup> Nuria Ferrol González**  
Doctora en Ciencias Químicas  
Investigador Científico del CSIC

Fdo.:

**D<sup>a</sup> Concepción Azcón González de Aguilar**  
Doctora en Ciencias, sección Biológicas  
Profesor de Investigación del CSIC

**Universidad de Granada**

Octubre, 2012

## **Financiación y publicaciones**

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos (Grupo de investigación "Micorrizas") de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

Para la realización del siguiente trabajo, el Ldo. Jacob Rafael Pérez Tienda fue financiado por las siguientes fuentes:

- Beca predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, disfrutada desde el 1 de Enero de 2006 hasta el 31 de Diciembre de 2009.
- Proyectos de Investigación del Plan Nacional AGL2006-08218/AGR y AGL2009-08868 del Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Estancia breve a cargo de proyecto (AGL2006-08218/AGR) en la Universidad Jaime I de Castellón (Departamento de Ciencias Agraria y del Medio Natural), bajo la supervisión de la Dra. Pilar García-Agustín. 7 al 21 de Enero 2008.
- Beca de movilidad I3P para estancias breves del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, disfrutada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid), bajo la supervisión de la Dra. Pilar Sánchez Testillano. Octubre-Diciembre de 2008.
- Ayuda de movilidad MEC HI2007-0229 para estancias breves del Programa de Acciones Integradas del Ministerio de Ciencia e Innovación, disfrutada en la Università degli Studi di Torino (Dipartimento di Biologia Vegetale), bajo la supervisión de la Dra. Luisa Lanfranco y la Dra. Raffaella Balestrini. 25 de mayo al 5 de junio de 2010.



Parte de los resultados presentados en esta Memoria de Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales o están en vías de publicación:

**Pérez-Tienda J**, Valderas A, Camañes G, García-Agustín P, Ferrol N (2012) Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* 22: 485–491.

**Pérez-Tienda J**, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2011) GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 1044-1055.

**Pérez-Tienda J**, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N.  $\text{NH}_4^+$  assimilation pathways in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (En preparación).

**Pérez-Tienda J**, Corrêa A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. Transcriptional regulation of host  $\text{NH}_4^+$  transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots (En preparación).

## **Agradecimientos**

Quisiera aprovechar estas primeras líneas para expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, y especialmente:

A las Dras. Nuria Ferrol y Concepción Azcón, directoras de esta Tesis Doctoral, por su ayuda, dedicación y profesionalidad. Mi más sincero agradecimiento.

A los Drs. Karim Benabdellah y Juan Antonio López, por sus sugerencias e ideas, así como por su amistad.

A las Dras. Pilar Sánchez Testillano y M<sup>a</sup> Carmen Risueño del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC-CIB, Madrid), por permitirme trabajar en su laboratorio y aprender nuevas técnicas. Por el trato recibido y el cariño mostrado en todo momento. Quiero también agradecer la ayuda y colaboración del resto de los miembros del laboratorio, María, Ivett y Tere, que hicieron tan agradable mi estancia en el CIB.

A la Prof. Pilar García Agustín y la Dra. Gemma Camañes de la Universidad Jaime I, por su apoyo y fructífera colaboración. Al Prof. Miguel Cerezo, por sus consejos y disposición.

A las Dras. Luisa Lanfranco, Raffaella Balestrini y Valentina Fiorilli de la Univesità degli Studi di Torino, por su disposición y colaboración.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo.

A todas las personas que trabajan en la Estación Experimental del Zaidín y, en especial, al grupo de Micorrizas. De manera particular quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Carmen, Ana Corrêa, Miguel, Ana Jiménez y Eli, su compañerismo y amistad. Con ellos he compartido risas, alegrías, penas, complicidades e incontables horas de laboratorio. Gracias por los buenos momentos vividos, tanto fuera como dentro del laboratorio.

No me quiero olvidar de aquellos compañeros que ya no están o estuvieron de paso: Manolo, Sonia, Iván Sánchez y Javi Serrano, gracias por vuestro compañerismo, amistad y apoyo desde el “exilio”.

Al grupo de los Drs. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana y Francisco del Rey Iglesias del Instituto de Microbiología Bioquímica (USAL-CSIC, Salamanca), en especial a Ana, María, Eva, Yolanda y Encarna. Gracias por el cariño recibido en todo momento, despertar en mí constantemente las ganas por hacer ciencia y, claro está, por vuestra amistad.

A mis amigos, Manuel, Antonio, Marcos, Paco y Alberto.

A mis padres, por su amor, apoyo y comprensión en todos los momentos de mi vida. Por la educación y los valores recibidos. Gracias de corazón.

A Chon, por su amistad y cariño. Por la comprensión, ayuda y paciencia incondicional mostradas durante todos estos años sin las cuales no habría sido capaz de concluir este trabajo. Este esfuerzo también es tuyo.

A todos ellos, **GRACIAS**

**A mis padres  
A Chon**



# ÍNDICE

I. INTERÉS DEL TRABAJO .....	3
II. INTRODUCCIÓN .....	9
1. Micorrizas .....	9
1.1. Micorrizas arbusculares .....	11
1.1.1. Hongos formadores de micorrizas arbusculares .....	13
1.1.1.1. Filogenia, el phylum Glomeromycota .....	13
1.1.1.2. Características generales de los hongos MA .....	14
1.1.2. Desarrollo y establecimiento de la simbiosis .....	19
1.1.2.1. Fase presimbiótica .....	21
1.1.2.2. Fase simbiótica .....	23
1.1.3. Bases moleculares de la nutrición en MA .....	29
1.1.3.1. Adquisición de nutrientes minerales desde el suelo y transferencia a la planta .....	30
1.1.3.2. Transferencia de carbono desde la planta .....	34
2. El nitrógeno en la biosfera .....	38
2.1. El amonio como fuente de N para plantas y microorganismos .....	40
2.1.1. Cinética de la absorción de amonio .....	42
2.1.2. Transportadores de amonio .....	44
2.1.2.1. AMTs en hongos .....	45
2.1.2.2. AMTs en plantas .....	47
2.1.3. Asimilación de amonio .....	48
3. Absorción, transporte y metabolismo del N en micorrizas arbusculares .....	51
III. OBJETIVOS .....	59
IV. MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL .....	63
1. Materiales biológicos y condiciones de crecimiento .....	63
1.1. Micorrizas .....	63
1.1.1. Hongo MA, <i>Glomus intraradices</i> .....	63
1.1.1.1. Cultivos monoxénicos .....	63
1.1.1.1.1. Obtención de diferentes estructuras fúngicas .....	64
1.1.1.1.1.1. Esporas .....	64
1.1.1.1.1.2. Micelio extrarradical .....	65
1.1.1.1.1.3. Raíces micorrizadas (micelio intrarradical) .....	65

1.1.1.1.2. Tratamientos del micelio extrarradical .....	66
1.1.1.1.2.1. Nitrógeno .....	66
1.1.1.1.2.2. Carbono .....	66
1.1.1.2. Preparación de inóculo <i>in vivo</i> .....	67
1.1.2. Planta hospedadora, <i>Oryza sativa</i> L. ....	67
1.1.2.1. Esterilización y germinación de semillas .....	67
1.1.2.2. Sustrato de crecimiento .....	68
1.1.2.3. Inoculación con el hongo micorrícico.....	68
1.1.2.4. Condiciones de crecimiento.....	69
1.1.2.5. Tratamientos experimentales .....	69
1.1.3. Sistema “sándwich”, <i>Medicago sativa</i> - <i>G. intraradices</i> .....	70
1.1.4. Tinción de raíces y cuantificación de la colonización micorrícica.....	70
1.1.5. Índice MGR .....	71
1.1.6. Análisis de nutrientes en hojas de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	71
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	72
1.2.1. Medios de cultivo .....	72
1.2.1.1. Medio YPD .....	72
1.2.1.2. Medio SD .....	73
1.2.1.3. Medio YNB-N .....	74
1.2.2. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	74
1.2.3. Mantenimiento de las cepas.....	75
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	76
1.3.1. Medios de cultivo .....	76
1.3.1.1. Medio LB (Lysogeny broth).....	76
1.3.1.2. Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) .....	77
1.3.2. Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....	78
1.3.3. Transformación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....	79
1.3.4. Mantenimiento de las cepas.....	79
2. Determinaciones cinéticas .....	80
2.1. Medida y determinación de los parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en el micelio extrarradical de <i>G. intraradices</i> .....	80
2.1.1. Determinación del influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$ .....	80
2.1.2. Determinación de los parámetros cinéticos de influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$ .....	81
2.1.3. Tratamientos experimentales.....	81
2.1.3.1. Efecto del pH.....	82
2.1.3.2. Efecto de inhibidores metabólicos .....	82
2.1.3.3. Efecto del aporte de carbono .....	82
2.2. Medida del influjo de $^{14}\text{C}$ metilamina hidrocloclhídrica en levadura.....	82
3. Técnicas de biología molecular.....	84
3.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos .....	84
3.1.1. Extracción de ADN genómico de <i>G. intraradices</i> .....	84
3.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>O. Sativa</i> .....	84

3.1.3.	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	85
3.1.4.	Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .....	85
3.1.5.	Extracción rápida de ADN total a partir de colonia.....	86
3.1.6.	Extracción de ARN de <i>G. intraradices</i> .....	87
3.1.7.	Extracción de ARN de células microdisecionadas por láser.....	87
3.1.8.	Extracción de ARN de <i>O. Sativa</i> .....	87
3.1.9.	Tratamiento con DNasa.....	89
3.2.	Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos.....	90
3.2.1.	Cuantificación.....	90
3.2.2.	Visualización del ADN.....	90
3.2.3.	Visualización del ARN.....	91
3.3.	Manejo de ácidos nucleicos.....	91
3.3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	91
3.3.1.1.	ADN Polimerasas utilizadas.....	94
3.3.2.	Adición de adenina al extremo 3' de productos de PCR.....	94
3.3.3.	RACE.....	95
3.4.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	97
3.5.	Técnicas de clonación en vectores.....	97
3.5.1.	Vectores utilizados.....	97
3.5.2.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	98
3.5.3.	Desfosforilación de vectores de clonación.....	98
3.5.4.	Ligación de productos de PCR.....	98
3.5.5.	Ligación de fragmentos de restricción.....	99
3.6.	Paseo cromosómico.....	99
3.7.	Secuenciación.....	99
3.8.	Análisis de expresión génica.....	100
3.8.1.	Retrotranscripción del ARN: síntesis de ADNc.....	100
3.8.2.	PCR cuantitativa a tiempo real.....	101
3.8.3.	RT-PCR.....	102
4.	Técnicas bioquímicas.....	102
4.1.	Extracción de microsomas de <i>G. intraradices</i> .....	102
4.2.	Extracción de microsomas de levadura.....	103
4.3.	Cuantificación de proteínas.....	104
4.4.	Electroforesis SDS-PAGE de proteínas microsomales.....	104
4.5.	Tinción de las proteínas en gel.....	105
4.6.	Obtención y purificación de anticuerpos policlonales.....	105
4.7.	Western Blot.....	106
4.7.1.	Transferencia de proteínas a la membrana.....	106
4.7.2.	Inmunodetección.....	107
5.	Técnicas de microscopía.....	107
5.1.	Fijación y preparación de muestras de micelio extrarradical de <i>G. intraradices</i> .....	107
5.2.	Inmunofluorescencia en micelio de <i>G. intraradices</i> .....	108



5.2.1. Montaje de las muestras .....	108
5.2.2. Permeabilización de las muestras .....	108
5.2.3. Inmunodetección .....	109
5.3. Microdissección láser .....	110
6. Métodos bioinformáticos.....	110
6.1. Búsqueda de secuencias de interés en bases de datos.....	110
6.2. Análisis y manejo de secuencias .....	111
6.3. Análisis de promotores .....	111
6.4. Predicción de la topología de proteínas transmembrana.....	111
6.5. Diseño de cebadores de PCR.....	112
6.6. Análisis filogenético de proteínas.....	112
7. Métodos estadísticos .....	112
V. Kinetics of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus <i>G. intraradices</i> ....	115
1. Introduction.....	115
2. Materials and methods .....	117
2.1. Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures and treatments.....	117
2.2. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uptake measurements .....	117
2.3. Kinetics of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> influx .....	118
2.4. External pH effect .....	118
2.5. Metabolic inhibitor studies.....	118
2.6. Effect of acetate.....	119
2.7. Statistical analysis .....	119
3. Results .....	119
3.1. Kinetics of <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uptake by the <i>G. intraradices</i> ERM.....	119
3.2. Energetics of <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uptake.....	121
3.3. Regulation of <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uptake by acetate .....	122
4. Discussion.....	123
VI. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus <i>Glomus intraradices</i> .....	129
1. Introduction .....	129
2. Experimental procedures .....	131
2.1. Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures and treatments.....	131
2.2. Nucleic acids extraction and cDNA synthesis.....	133
2.3. Isolation of the GintAMT2 gene.....	133
2.4. Sequence analyses.....	134
2.5. Heterologous expression of GintAMT2 in yeast .....	134
2.6. Real-Time quantitative RT-PCR.....	139
2.7. Antibody production.....	136

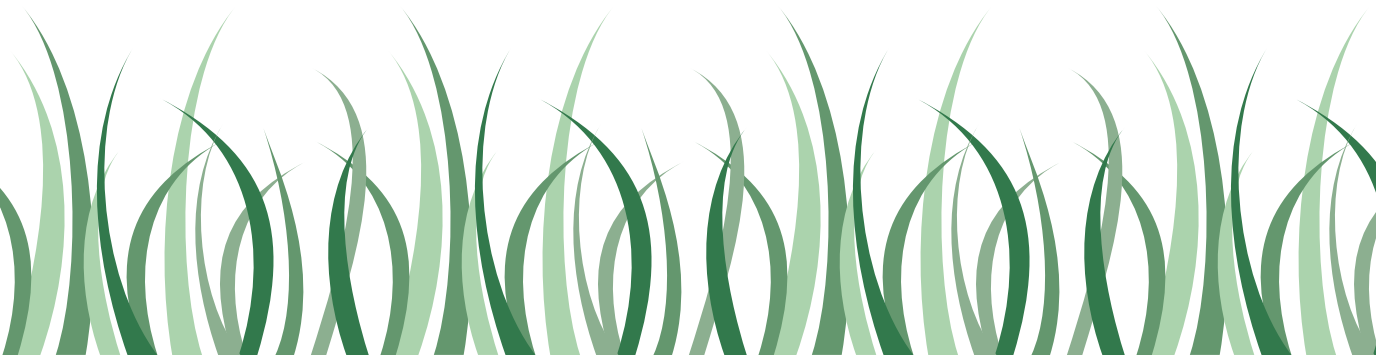
2.8. Isolation of microsomes .....	136
2.9. SDS/PAGE and Western-blot analysis .....	137
2.10. Immunolocalization of GintAMT2 .....	138
2.11. Laser microdissection (LMD) .....	139
3. Results .....	140
3.1. Sequence analysis of GintAMT2 .....	140
3.2. GintAMT2 is a functional AMT .....	143
3.3. GintAMT2 response to nitrogen .....	144
3.4. Effect of different carbon sources on gene expression .....	146
3.5. GintAMT2 is up-regulated during the intraradical symbiotic phase .....	146
3.6. Immunolocalization of GintAMT2 .....	148
3.7. GintAMT1 and GintAMT2 are expressed in arbuscules .....	150
4. Discussion .....	150
VII. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> assimilation pathways in the arbuscular mycorrhizal fungus <i>Glomus intraradices</i> .....	159
1. Introduction .....	159
2. Experimental procedures .....	161
2.1. Biological material and N treatments .....	161
2.2. Arbusculate-colonized cortical cell collection by laser microdissection .....	162
2.3. Nucleic acids extraction and cDNA synthesis .....	162
2.4. Blast searches .....	162
2.5. Isolation of the GOGAT and GDH1 genes .....	162
2.6. Sequence analyses .....	163
2.7. Gene expression .....	163
3. Results .....	164
3.1. <i>In silico</i> sequences analyses .....	164
3.2. GOGAT and GDH1 expression in intra- and extraradical mycelia .....	168
3.3. Effect of N on GOGAT and GDH1 transcript levels .....	171
3.4. GOGAT and GDH1 response to MSX .....	172
4. Discussion .....	173
VIII. Transcriptional regulation of host NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots .....	179
1. Introduction .....	179
2. Materials and Methods .....	182
2.1. Plant materials, growth conditions and inoculation methods .....	182
2.2. Analysis of mycorrhizal colonization and plant growth responses .....	183
2.3. Elemental analyses .....	183
2.4. Identification of the rice AMT, GS and GOGAT sequences .....	184
2.5. Phylogenetic analysis of the rice AMT sequences .....	184
2.6. RNA isolation and cDNA synthesis .....	184

2.7. Gene expression analysis .....	185
2.8. Statistical analysis .....	185
3. Results .....	186
3.1. AM colonization and plant growth.....	186
3.2. Effect of the AM symbiosis on N, P and C leaf concentrations.....	188
3.3. The <i>Oryza sativa</i> AMT gene family .....	188
3.4. Expression profiles of AMT genes.....	190
3.5. Regulation of the GS/GOGAT pathway in AM roots.....	190
4. Discussion .....	192
IX. CONCLUSIONES .....	201
X. BIBLIOGRAFÍA .....	205



**Intéres del trabajo**

**I**





## Interés del trabajo

El N es un nutriente esencial y limitante del desarrollo de las plantas, por lo que anualmente se consumen entre 85 y 90 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados en el mundo. Los fertilizantes nitrogenados comerciales representan un gran coste en la producción agrícola, sobre todo en los cultivos de cereales, que son la base de la alimentación de gran parte de la humanidad. Se ha estimado que entre el 50 y el 70% del nitrógeno suministrado al suelo se pierde por lixiviación, lo que conlleva una gran pérdida económica e importantes problemas medioambientales, provocando la eutrofización de las aguas y, al llegar a los acuíferos, la contaminación de las aguas destinadas al consumo humano. Además, mediante el proceso de desnitrificación se produce la emisión a la atmósfera de óxido nítrico ( $N_2O$ ), un poderoso gas de efecto invernadero, responsable en gran medida del calentamiento global. Es necesaria, por tanto, la búsqueda de alternativas eficaces, respetuosas con el medio ambiente y compatibles con una producción agrícola que satisfaga la creciente demanda de alimentos a nivel mundial. Estas alternativas constituyen lo que se ha convenido en llamar agricultura sostenible. En este contexto, existe un interés creciente en el manejo racional de los microorganismos beneficiosos del suelo ya que, por el amplio espectro de actividades que desarrollan, ejercen una gran influencia sobre la fertilidad del mismo y sobre el desarrollo y salud de la plantas.

Entre estos microorganismos beneficiosos se encuentran determinados hongos microscópicos, biotrofos obligados, que viven asociados a las raíces de la mayoría de las plantas terrestres. Esta asociación planta-hongo constituye la simbiosis mutualista más extendida y antigua del reino vegetal,

y recibe el nombre de micorrizas arbusculares (MA). La importancia ecológica y económica de las MA está avalada por su presencia en más del 80% de las especies vegetales. Entre ellas se encuentran la mayoría de las plantas de interés agronómico, ya sean hortícolas, frutícolas, forrajeras, constituyentes de pastizales y también árboles y arbustos de ecosistemas naturales.

Los hongos formadores de MA (hongos MA) colonizan biotróficamente el córtex de la raíz, y desarrollan un extenso micelio en el suelo que la rodea. Este actúa a modo de sistema radical complementario, altamente eficaz, que ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales, especialmente fosfato, y agua. Aunque tradicionalmente se ha atribuido la estimulación del crecimiento vegetal producido por las MA a la mejora en la adquisición de fosfato inorgánico, cada vez hay más evidencias que indican que las MA desempeñan también un papel importante en la nutrición nitrogenada de la planta. Además, la formación de MA ejerce otros efectos beneficiosos sobre la planta hospedadora ya que la protegen frente a estreses de tipo biótico (ataque de patógenos) y abiótico (contaminación por metales, salinidad, sequía, etc.). A su vez, la planta hospedadora proporciona al hongo carbohidratos derivados de la fotosíntesis. Se estima que hasta un 20% de los fotoasimilados de la planta micorrizada pueden ser transferidos al hongo, por lo que el desarrollo de la simbiosis supone un considerable coste energético para la planta. Sin embargo, de forma general, los beneficios que la planta recibe del hongo son superiores a los costes. Hay que considerar, además, que las hifas de los hongos MA que se desarrollan en el suelo influyen procesos clave de los ecosistemas ya que favorecen la formación de agregados hidroestables en el suelo, lo que mejora su estructura y reduce el riesgo de erosión.

El efecto beneficioso que el establecimiento de micorrizas ejerce sobre la nutrición mineral de la planta ha determinado que actualmente se preste especial atención a la aplicación de los hongos MA como biofertilizantes. Sin embargo, la explotación del potencial que las MA representan, necesita de una investigación básica apropiada que permita entender los mecanismos moleculares que determinan la eficiencia de las asociaciones micorrícicas.

Aunque el resultado de la simbiosis va a depender de factores tales como los genotipos de la planta y el hongo implicados en la asociación y las condiciones ambientales en las que se desarrolla, el conocimiento en profundidad de los mecanismos implicados en la interacción permitirá maximizar los efectos beneficiosos de la misma.

Durante los últimos años se han producido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en la mejora de la nutrición fosfatada de la planta hospedadora. Estos avances han sido posibles gracias al estudio molecular de las proteínas de la planta y el hongo implicadas en la absorción de P del suelo y su metabolismo, así como de aquellas implicadas en la transferencia del fosfato a la planta hospedadora. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre los procesos implicados en la absorción de diferentes compuestos nitrogenados por el hongo, su asimilación y posterior transferencia a la planta tan sólo empiezan a vislumbrarse. Con el fin de profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la mejora de la nutrición nitrogenada en plantas micorrizadas se planteó como objetivo general de la presente Memoria de Tesis Doctoral el **estudio de los mecanismos implicados en el transporte y asimilación de N en micorrizas arbusculares**. Para ello, se utilizó como material biológico *in vitro* cultivos monoxénicos de *Glomus intraradices* y raíces transformadas de zanahoria, y como modelo experimental *in vivo* la asociación planta-hongo establecida entre *Oryza sativa* y *G. intraradices*.

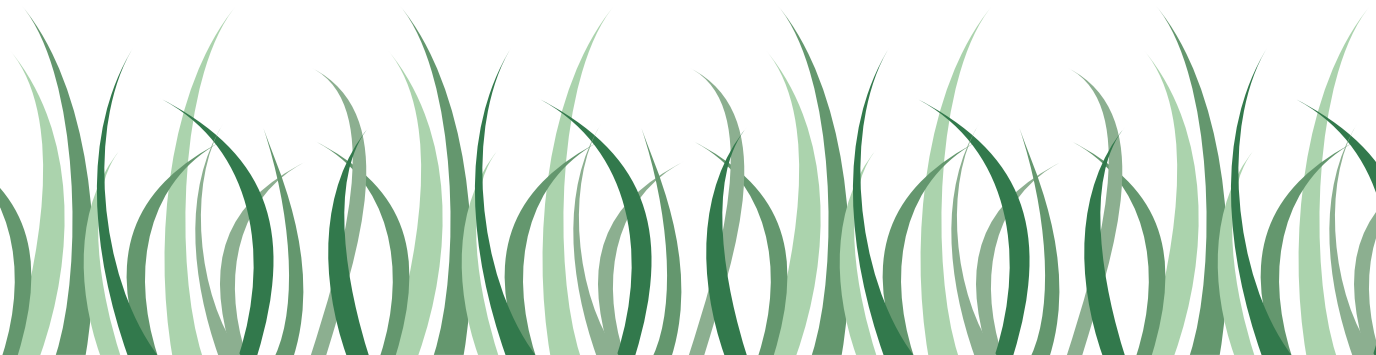






## Introducción General

II





## 1. Micorrizas

La palabra *micorriza* (del griego *mikos*, hongo, y *rhiza*, raíz) describe la asociación simbiótica que se establece entre determinados hongos del suelo y las plantas. Este término fue utilizado por primera vez por Bernhard Frank en 1885 mientras estudiaba la viabilidad del cultivo de la trufa, pero no es hasta mediados del siglo XX cuando empieza a ponerse de manifiesto el significado y la importancia de estas asociaciones, así como su presencia en la práctica totalidad de los sistemas suelo-planta (Barea y Jeffries, 1995). Las micorrizas son, en general, simbiosis de carácter mutualista, en las que el hongo le proporciona a la planta nutrientes minerales y agua procedentes del suelo y, a cambio, la planta le cede al hongo hidratos de carbono derivados de la fotosíntesis.

En la actualidad se estima que entre el 90 y 95% de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorrizas. En base a criterios morfológicos y funcionales, se han descrito tres grandes tipos de micorrizas (Smith y Read, 2008; Finlay 2008):

- **Ectomicorrizas.** Las presentan especies de interés forestal como Fagáceas, Pináceas y Quercíneas, entre otras familias características de bosques de zonas templadas. Se caracterizan principalmente porque las hifas del hongo limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex, sin penetrar en el interior de las células de la raíz, formando la característica red de Hartig. La superficie de la raíz queda rodeada por un denso entramado de hifas que constituyen el

denominado manto (Smith y Read, 2008). Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen al phylum Basidiomycota, aunque también algunos miembros del phylum Ascomycota pueden formar la simbiosis, estimándose que al menos 10 000 especies de hongos y 8 000 especies de plantas pueden estar implicadas en este tipo de asociación micorrícica (Taylor y Alexander, 2005).

- **Endomicorrizas.** Se caracterizan principalmente porque las hifas del hongo penetran en el interior de las células de la epidermis y/o córtex de la raíz, pero sin atravesar nunca la membrana plasmática. Son las más extendidas en la naturaleza, en cuanto a especies vegetales que las establecen y ecosistemas en que se encuentran. Dentro de este grupo podemos distinguir tres subgrupos fundamentales:
  - o *Ericoides*. Este tipo de endomicorrizas es característico de las plantas de la familias Ericaceae, Empetraceae y Epacridaceae (todas pertenecientes al orden Ericales) y de hongos pertenecientes mayoritariamente al phylum Ascomycota, aunque también algunos Basidiomycota pueden formar este tipo de micorriza. En general, los hongos implicados presentan una gran versatilidad en el uso de distintas fuentes de C, N y P (de origen orgánico o inorgánico), lo que confiere a las plantas formadoras de este tipo de micorrizas capacidad para crecer en suelos con elevado contenido de materia orgánica (Pearson y Read, 1975; St-John et al., 1985).
  - o *Orquidoides*. Este tipo de endomicorrizas lo forman plantas de la familia Orquidaceae y hongos del phylum Basidiomycota. En esta asociación, la planta, que presenta una fase heterótrofa en su ciclo de vida, recibe compuestos carbonados a través del hongo (Smith, 1966). El hongo penetra en las células de la raíz invaginando la membrana plasmática de la célula hospedadora. Dentro de las células forma ovillos y agregados de hifas poco estructurados que al degenerar liberan los nutrientes que contienen.

- *Arbusculares*. Son las más extendidas en la naturaleza. Se caracterizan por formar arbusculos (estructuras fúngicas muy ramificadas) en el interior de las células del córtex. Dado que la presente Memoria de Tesis Doctoral ha tenido como objetivo el estudio de este tipo de micorrizas, su estructura y función se tratarán con mayor detalle en los siguientes apartados de la Introducción.
- **Ectendomicorrizas**. Son las menos extendidas y presentan características comunes con los dos tipos de micorrizas expuestos anteriormente. Presentan un manto más o menos denso, una red de Hartig normalmente bien desarrollada y, con frecuencia, las hifas penetran ligeramente en el interior de las células del córtex, formando enrollamientos u ovillos (Yu et al., 2001; Gutiérrez et al., 2003). Los hongos que forman este tipo de micorriza pertenecen al phylum Basidiomycota y las plantas a la familia Ericaceae (fundamentalmente a los géneros *Arbutus* y *Monotropa*).

### 1.1 Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares (MA) son, probablemente, la asociación simbiótica terrestre más extendida en la naturaleza. La forman entre el 70 y 80% de las especies de plantas terrestres y los hongos pertenecientes al phylum monofilético Glomeromycota (Schüßler et al., 2001; Hibbett et al., 2007). Tan sólo algunos taxones vegetales no presentan dicha asociación, como son las familias Cruciferae, Fumariaceae, Urticaceae, Polygonaceae y Quenopodiaceae (Wang y Qiu, 2006).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos MA) son simbioses obligados que dependen de la planta hospedadora para completar su ciclo de vida. La planta suministra al hongo compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis. A cambio, el hongo aporta a la planta nutrientes minerales y agua que absorbe del suelo a través de su micelio externo o extrarradical (ERM, del inglés *extraradical mycelium*) (Smith y Read, 2008). En el interior de las células del córtex de la raíz, el hongo

desarrolla unas estructuras arborescentes denominadas arbuscúlos (del latín *arbusculum*, que significa arbusto o árbol pequeño), que se encuentran rodeadas por la membrana plasmática de la célula que los alberga (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Es a nivel de los arbuscúlos en donde se admite que transcurre el intercambio bidireccional de nutrientes entre la planta y el hongo (Balestrini y Bonfante, 2005; Ferrol y Pérez-Tienda, 2009).

Los efectos beneficiosos de la simbiosis MA en la nutrición mineral de la planta hospedadora pueden explicarse, en parte, por el aumento de superficie efectiva que el micelio extrarradical del hongo MA le aporta a la raíz. Así, sabemos que la red de micelio externo puede alcanzar una densidad de hasta 100 metros de hifas por centímetro cúbico de suelo (Miller et al., 1995). Las hifas del hongo, por su tamaño (con un diámetro medio de 3-4  $\mu\text{m}$ ) y distribución, son capaces de explorar un volumen de suelo mayor que las propias raíces, penetrando en poros y cavidades del suelo en los que las raíces, por su tamaño (diámetro  $\geq 10 \mu\text{m}$ ), no pueden penetrar (Bolan 1991; Jakobsen 1994). Por otro lado, las hifas de los hongos MA son capaces de absorber y transportar nutrientes desde largas distancias, superando las zonas de agotamiento en agua y nutrientes minerales que rodean a las raíces. Esto es especialmente importante para aquellos nutrientes que difunden lentamente en la solución del suelo, como es el caso del fósforo (Jakobsen 1994; Miller et al., 1995). Otros estudios sugieren que las hifas son capaces de competir más eficientemente que las raíces con otros microorganismos del suelo por la absorción de nutrientes (Linderman 1992).

Debido a su importante papel en la adquisición de nutrientes minerales por la planta, principalmente P, frecuentemente se considera a los hongos MA como una mera extensión del sistema radical de la planta. Esta visión simplista ignora, entre otras cosas, las necesidades nutricionales del hongo, las cuales pueden competir con las de la planta cuando la disponibilidad de determinados nutrientes es baja. A pesar de la visión más "micocéntrica" de algunos autores (Fitter et al., 2000; Alberton et al., 2005), se tiende a considerar que lo que es "bueno" para la planta, lo debe ser también para el hongo, y que el hongo siempre actúa en beneficio de su planta hospedadora (Hodge et al., 2010). Por lo general, los efectos beneficiosos de las MA son

más evidentes bajo condiciones limitantes de algunos nutrientes, especialmente P, y aunque los mecanismos reguladores no se conocen bien, se observa una disminución en el grado de colonización de la raíz por los hongos MA cuando aumenta la fertilidad del suelo.

Aunque el principal beneficio de las MA es la mejora de la nutrición mineral de la planta, la formación de la simbiosis también la protege frente a estreses de tipo biótico (ataque de organismos patógenos) (Harrier y Watson, 2004; Liu et al., 2007; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Koricheva et al., 2009) y abiótico (salinidad, sequía, frío, presencia de metales pesados...) (Göhre y Paszkowski, 2006; Ruiz-Lozano et al., 2006; Aroca et al., 2007; Ferrol et al., 2009). Adicionalmente, la red de hifas del hongo que se desarrolla en el suelo contribuye a mejorar la estructura del mismo al facilitar la formación de agregados estables en agua (Piotrowski et al., 2004; Rillig y Mummey, 2006).

### **1.1.1 Hongos formadores de micorrizas arbusculares**

Como se ha indicado anteriormente, los hongos MA son simbioses estrictos, incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedadora. Ello dificulta su manejo, complica su estudio e implica que aún se desconozcan aspectos básicos de su biología y de sus estrategias de supervivencia en el suelo. A continuación se resumen algunos aspectos importantes de su filogenia y biología.

#### **1.1.1.1 Filogenia, el phylum Glomeromycota**

Tal y como sugieren los registros fósiles de los hongos MA (Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000), su origen se remonta al Ordovícico (hace unos 460 millones de años), período en el que tuvo lugar la colonización del medio terrestre por las plantas a partir del medio acuático. En 1975, Pirozynski y Malloch propusieron que los hongos MA habían desempeñado un papel determinante en esta transición, ayudando a los antecesores de las plantas actuales, las cuales disponían de rizomas o rizoides, en la absorción de agua y nutrientes minerales de baja movilidad como el P. Hoy día existen



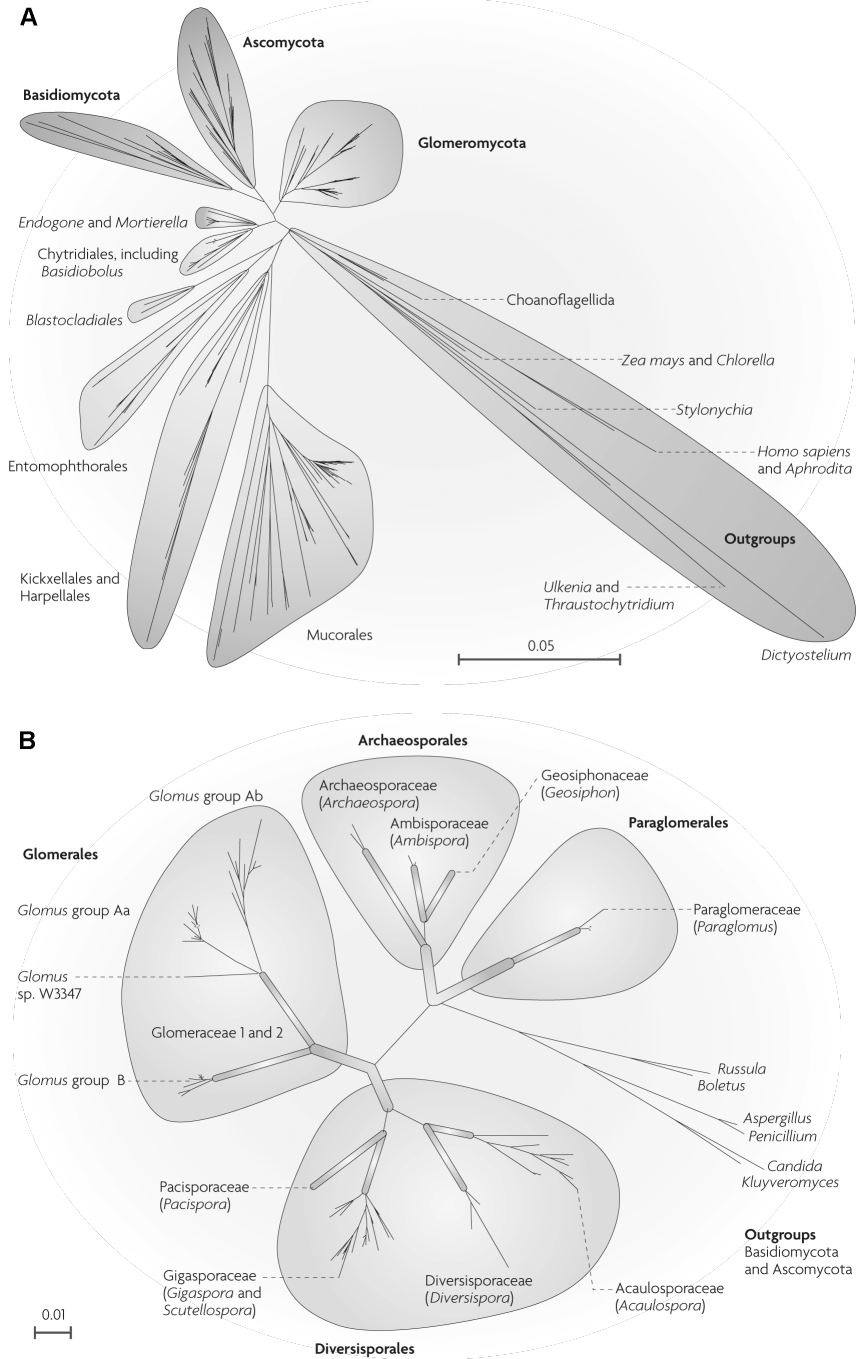
evidencias adicionales de esta temprana asociación de hongos MA con plantas primitivas, como son las asociaciones con briofitos (Schüßler 2000).

En base al análisis de la secuencia del gen que codifica la subunidad pequeña (SSU, del inglés *small subunit*) del ARN ribosomal se ha podido determinar el origen monofilético de los hongos MA, quedando agrupados en el phylum Glomeromycota, un clado hermano de Asco- y Basidiomycota (Subreino Dikarya) (Schüßler et al., 2001; Hibbett et al., 2007; Krüger et al., 2012) [Figura 1A]. Este phylum incluye una sola clase, los Glomeromycetes y cuatro órdenes (Diversisporales, Glomerales, Archaeosporales y Paraglomerales), tal como se refleja en la Figura 1B. Recientemente, Lee y Young (2009), basándose en la secuencia de 14 genes mitocondriales, han propuesto que los hongos MA no son un clado hermano de los Dykaria, sino que pueden pertenecer a uno de los linajes parafiléticos de los Zygomycota, un grupo cuya clasificación está siendo discutida en la actualidad.

En base a criterios morfológicos se han descrito unas 220 especies de hongos MA, aunque estudios de ecología molecular sugieren que la diversidad de estos organismos es mucho mayor (Fitter 2005; Santos et al., 2006).

### **1.1.1.2 Características generales de los hongos MA**

Como se ha indicado anteriormente, los hongos MA y las plantas han evolucionado en una estrecha e íntima relación desde hace unos 460 millones de años. Quizás sea esta evolución conjunta la causa de una de las características principales de este tipo de hongos, su carácter de biotrofos obligados. Todos los hongos MA requieren de una planta hospedadora para completar su ciclo de vida, que culmina con la formación de nuevos propágulos viables (Azcón-Aguilar et al., 1991, 1999). Esta característica es el principal determinante de la dificultad que presentan tanto el estudio de la biología de los hongos MA, como su desarrollo biotecnológico.



**Figura 1. (A)** Filogenia propuesta para los hongos MA basada en la secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. **(B)** Estructura taxonómica propuesta para el phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr, mostrando las relaciones entre los diferentes ordenes y géneros. Tomado de Parniske (2008).

No se les conoce ninguna fase de reproducción sexual, pero sí la formación de esporas de resistencia sobre hifas vegetativas. Se trata de esporas multinucleadas, con un número de núcleos que oscila desde los 720 de *Scutellospora castanea* (Hosny et al., 1998) a los 2 600 en especies del género *Gigaspora* (Cooke et al., 1987; Bécard y Pfeffer, 1993). Se ha propuesto que el principal mecanismo responsable de la formación de las esporas multinucleadas es el flujo masivo de núcleos desde la hifa de sustentación hacia la nueva espora (Jany y Pawlowska, 2010). Aunque se acepta que los hongos MA se reproducen asexualmente, análisis transcriptómicos recientes indican que estos hongos disponen de la información genética necesaria para llevar a cabo la meiosis y en consecuencia una reproducción sexual (Tisserant et al., 2012). Existen, además, indicios de variabilidad genética dentro de una misma espora, lo que se manifiesta por la presencia de polimorfismos a nivel de la secuencia de los genes que codifican el ARN ribosómico (Lanfranco et al., 1999; Clapp et al., 2001), así como en el número de estos *loci* en un mismo núcleo (Trouvelot et al., 1999). El origen de esta variabilidad genética es todavía confuso y polémico, puesto que esta variabilidad podría estar contenida en cada núcleo (modelo homocariótico) (Pawlowska y Taylor, 2004) o distribuida entre los diferentes núcleos (modelo heterocariótico) (Kuhn et al., 2001; Hijri y Sanders, 2005; Bever y Wang, 2005). También resulta polémico el tipo de multiplicación nuclear, clonal o con recombinación, con evidencias en ambos sentidos (Rosendahl y Taylor, 1997; Vandenkoornhuyse et al., 2001; Gandolfi et al., 2003; Croll y Sanders, 2009).

Al margen de los eventos de recombinación nuclear que puedan tener lugar, los hongos MA podrían aumentar su patrimonio genético mediante el intercambio de núcleos de unas colonias fúngicas con otras. Las hifas de los hongos MA son cenocíticas, con cientos de núcleos compartiendo un mismo citoplasma, al igual que en las esporas. En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto la formación de anastomosis entre hifas de la misma especie e incluso entre aislados muy relacionados entre sí (Giovannetti et al., 2001; de la Providencia et al., 2005; Purin y Morton, 2011), permitiendo el intercambio de núcleos (Giovannetti et al., 2001).

La primera estimación del tamaño del genoma de los hongos MA fue proporcionada por Bianciotto y Bonfante (1992), quienes determinaron que el contenido de ADN nuclear de *Glomus versiforme* era de 250 Mb y el de *Gigaspora margarita* de 740 Mb. En 1998, Hosny y colaboradores analizaron mediante citometría de flujo once hongos MA, concluyendo que el contenido en ADN de los núcleos de los distintos hongos podía variar en más de 8 veces (desde 127.4 Mb en *Scutellospora pellucida* hasta 1058.4 en *S. gregaria*). Sorprendentemente, el genoma de *Glomus intraradices* DAOM197198, recientemente renombrado por Krüger y colaboradores (2012) como *Rhizophagus irregularis* DAOM197198, resultó ser muy pequeño, próximo al límite de los genomas eucariotas (14.07±3.52 Mb); además, ensayos de cinéticas de reasociación indicaron su condición haploide (Hijri y Sanders, 2004). Por el pequeño tamaño de su genoma, entre otras razones, este hongo fue seleccionado como hongo MA modelo para ser secuenciado (Martin et al., 2004). Los proyectos de secuenciación desarrollados hasta la fecha, la mayoría de ellos basados en la técnica conocida como *whole-shotgun genome sequencing* (acrónimo en inglés WGS), han generado unas 345 Mb que han sido ensambladas en 163 968 contigs en un total de 52.5 Mb (Martin et al., 2008). Los resultados de estos proyectos indican que el tamaño del genoma de *G. intraradices* es de entre 120 y 150 Mb (unas 10 veces mayor del predicho experimentalmente).

En general, el genoma de los hongos MA consta tanto de secuencias de copia única, como de secuencias repetidas, ocupando estas últimas entorno al 1.6% del genoma de *G. intraradices* (Hijri y Sanders, 2004). Estas secuencias repetidas pueden ser muy numerosas, como las 2 600 copias de la secuencia SC1 encontrada en *S. castanea* (Zeze et al., 1996). Hay, sin embargo, otras muchas con menor número de copias repartidas por el genoma (Gollotte et al., 2006). No se han encontrado transposones, pero sí secuencias con homología con *Long Terminal-Repeats* (LTRs) de retrotransposones (Gollotte et al., 2006). Otra característica del genoma de estos hongos es su bajo contenido de GC, entorno al 30-35% (Hosny et al., 1997; Martin et al., 2008), con casi el 25% de la citosina metilada, un valor bastante alto para hongos. A modo de ejemplo, *Neurospora crassa* presenta tan sólo un 1-2% del total de la citosina metilada (Russel et al., 1987). En 2009, Lee y Young publicaron el

genoma completo mitocondrial de un aislado de *G. intraradices*, el cual presenta un tamaño de 70 606 pb, un contenido en GC algo superior al del genoma nuclear (37.2%) y, aunque presenta una serie de genes similares, muestra notables diferencias con los de otros hongos.

Además de la identificación de genes relacionados con la maquinaria de recombinación meiótica, la reciente publicación del transcriptoma de *G. intraradices* ha puesto de manifiesto que durante la interacción simbiótica se inducen genes que codifican transportadores y pequeñas proteínas secretadas (SSPs, del inglés *small secreted proteins*). Esto, junto con la falta de expresión de genes que codifican para enzimas hidrolíticos que actúan sobre los polisacáridos de la pared celular, pone de manifiesto similitudes con los patrones de expresión de otros hongos simbioses, como son los ectomicorrícicos, y con algunos hongos biotrofos obligados patógenos (Tisserant et al., 2012). Sin embargo, el carácter del biotrofo obligado de *G. intraradices* no está asociado con una drástica reducción en su complejidad metabólica (como por ejemplo, la pérdida de vías de asimilación del N o del S), como se observa en algunos patógenos biotrofos obligados. Con la información obtenida del transcriptoma se espera poder desarrollar nuevas aproximaciones científicas que permitan descifrar el particular estilo de vida de los hongos MA.

A diferencia de otros hongos, hasta el momento no se han desarrollado protocolos de transformación estable en los hongos MA. Forbes y colaboradores (1998) consiguieron expresar de forma transitoria el gen reportero GUS en *Gigaspora rosea* mediante bombardeo de partículas y, años más tarde, usando la misma técnica, Helber y Requena (2008) consiguieron expresar de forma transitoria los marcadores fluorescentes GFP y DsRED en *G. intraradices*. En ambos casos, los genes introducidos se acababan perdiendo en generaciones sucesivas. Recientemente, Helber y colaboradores (2011) han utilizado una técnica novedosa (HIGS, del inglés *Host-Induced Gene Silencing*; Nowara et al., 2010) para silenciar genes fúngicos a través de la planta hospedadora. De este modo han conseguido silenciar la expresión de un gen que codifica para un transportador de monosacáridos (MST2) en *G. intraradices*.

Finalmente, en el citoplasma de algunos hongos MA se han identificado bacterias endosimbióticas. Un tipo de estos endosimbiontes, con forma de bacilo, está restringido a la familia Gigasporaceae y, al igual que los propios hongos que los albergan, son incapaces de desarrollar una fase de vida independiente (Jargeat et al., 2004). El origen y función de estas bacterias, identificadas como *Candidatus Glomeribacter gigasporarum*, es desconocido, aunque estudios moleculares revelan que están relacionadas con *Burkholderia*, un grupo de bacterias saprofitas que interviene en el reciclaje de la materia orgánica y que pueden actuar como patógenos de animales y plantas (Bianciotto et al., 2000, 2003). La eliminación de estas bacterias (curación) compromete seriamente el desarrollo y crecimiento presimbiótico del hongo (Lumini et al., 2007). El otro tipo de endosimbionte, con forma de coco y denominados BLOs (del inglés *bacterium-like organisms*), se ha detectado en el interior de diferentes hongos MA, tanto en esporas como en hifas (MacDonald et al., 1982). Recientes análisis moleculares los relacionan con un antiguo e inusual grupo de bacterias carentes de pared, las Mollicutes, que son parásitos celulares de algunas plantas y animales (Naumann et al., 2010).

### **1.1.2 Desarrollo y establecimiento de la simbiosis**

El establecimiento de la simbiosis MA requiere la activación de un complejo programa de desarrollo, tanto en la planta como en el hongo, cuyos determinantes genéticos han sido parcialmente descritos en la planta a través de la caracterización de líneas mutantes defectivas en el proceso de micorrización (Reinhardt 2007; Parniske 2008; Oldroyd et al., 2009). La uniformidad de las respuestas celulares inducidas por el desarrollo de la simbiosis en plantas, tanto en angiospermas, como en briofitas, pteridofitas y gimnospermas, sugiere la existencia de mecanismos moleculares y celulares comunes en todas ellas, de acuerdo con lo que cabría esperar de una interacción tan antigua como esta (Bonfante y Genre, 2008).

Al contrario de lo que ocurre en raíces infectadas por hongos patógenos, las raíces micorrizadas no muestran signos de daño alguno. La colonización de la raíz por los hongos MA provoca tan solo una activación débil, localizada y transitoria de los mecanismos de defensa de la planta (Smith y

Read, 2008). Es decir, la planta permite esa colonización sin mostrar resistencia aparente. Este hecho facilita la interacción estable de ambos simbiontes y es, en cierta medida, la base del biotrofismo de los hongos MA. Durante la interacción con las plantas, muchos microorganismos secretan pequeñas proteínas (SSPs), que entran en las células vegetales modificando el metabolismo y modulando las respuestas de defensa, es decir, actuando como efectores (Jiang 2011). Klopffholz y colaboradores (2011) han caracterizado la primera SSP en un hongo MA, denominada SP7. Estos autores han mostrado que SP7 entra en el núcleo de células de *Medicago truncatula* e interacciona con el factor de transcripción relacionado con patogénesis MtERF19. Esta interacción inhibe la activación de los genes de defensa mediada por MtERF19. El papel de SP7 también queda patente en la observación de que raíces que expresan constitutivamente SP7 presentan una mayor colonización micorrícica. La expresión de gran cantidad de SSPs en la fase intraradical del hongo micorrícico *G. intraradices* y en células arbusculadas (Tisserant et al., 2012) pone de manifiesto la importancia de estas proteínas en la simbiosis. Conocer su mecanismo de acción es un paso crucial para la comprensión de la compatibilidad planta-hongo MA.

Considerando la participación de las hormonas vegetales en casi todos los procesos de desarrollo de la planta, se piensa que estas pueden tener un papel clave durante el desarrollo de la simbiosis MA. Aunque se trata de un área de investigación poco explorada todavía, trabajos recientes sugieren que tanto el ácido abscísico (ABA), como los jasmonatos (JAs) podrían desempeñar un papel regulador importante en el establecimiento, desarrollo y mantenimiento de la simbiosis (Hause et al., 2007; Herrera-Medina et al., 2007; García-Garrido et al., 2010; López-Ráez et al., 2010). Por otro lado, trabajos de Hanlon y Coenen (2011) sugieren que la auxinas también pueden estar implicadas en el establecimiento y formación de la micorriza.

La formación de la simbiosis comprende dos fases fundamentales: (I) señalización y reconocimiento hongo-planta (fase presimbótica), y (II) colonización de la raíz y desarrollo de estructuras fúngicas intra- y extraradicales que permiten el establecimiento de una simbiosis funcional (fase simbiótica).

### 1.1.2.1 Fase presimbiótica

Numerosas evidencias indican la existencia de un diálogo molecular entre ambos simbioses previo al contacto físico entre la planta y el hongo. En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, las esporas son capaces de germinar incluso en ausencia de raíces (p.ej., en agar agua). Si las hifas producidas no encuentran una raíz susceptible de ser colonizada, el hongo retrae el citoplasma y la espora entra nuevamente en reposo (Azcón-Aguilar et al., 1999). Las esporas pueden experimentar múltiples y sucesivas rondas de germinación y retracción antes de encontrar una raíz susceptible de ser colonizada (Azcón 1987; Azcón-Aguilar et al., 1999). Cuando las hifas entran en el campo de influencia de una raíz compatible o son expuestas a sus exudados, se produce la ramificación de las mismas y una estimulación del crecimiento, aumentando de este modo la posibilidad de establecer contacto con la raíz. Este fenómeno, denominado “*branching*”, se conoce desde hace tiempo, pero la naturaleza molecular de los denominados factores de ramificación o “*branching factors*” no fue revelada hasta más recientemente (Akiyama et al., 2005). Hoy día se sabe que entre las moléculas señal responsables de la ramificación de las hifas en la rizosfera, así como de los cambios fisiológicos (inducción de la división nuclear, activación mitocondrial, etc.) que experimentan los hongos MA en respuesta a los exudados radicales, se encuentran las estrigolactonas (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006 y 2008). La secreción de estrigolactonas por la raíz al suelo y su rápida hidrólisis hace de ellas una magnífica señal de proximidad de la raíz en la rizosfera (García-Garrido et al., 2009; Akiyama et al., 2010; López-Ráez et al., 2011).

En un principio, las estrigolactonas se identificaron como lactonas de sesquiterpenos (Akiyama et al., 2005); sin embargo, posteriormente se ha demostrado que son un tipo de apocarotenoides, que derivan de la rotura enzimática oxidativa de los carotenoides por acción de las caroteno dioxigenasas (CCDs, del inglés *carotenoid cleavage dioxygenases*), y que comparten una ruta de síntesis similar a la del ABA (Matusova et al., 2005). Trabajos de López-Ráez y colaboradores (2008) han demostrado que la producción y secreción de estrigolactonas se induce en condiciones de ayuno



de fosfato inorgánico (Pi), habiéndose propuesto que este incremento podría ser utilizado por la planta como reclamo para “invitar” a los hongos MA a colonizar la raíz y obtener así el beneficio que estos le proporcionan. Cabe señalar que las estrigolactonas también estimulan la germinación de semillas de plantas parásitas, como las pertenecientes a los géneros *Striga* y *Orobancha*, que invaden la raíz de otras plantas. Puesto que los miembros de estos géneros aparecieron mucho más tarde que los hongos MA en la evolución, es previsible que estas plantas parásitas hayan copiado o adaptado en su propio beneficio parte de la señalización molecular previamente desarrollada por las raíces y los hongos MA. Recientemente se ha comprobado que las estrigolactonas constituyen un nuevo tipo de hormona vegetal, capaz de inhibir la ramificación del tallo (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008) y afectar al crecimiento de la raíz, induciendo su elongación y disminuyendo el número y longitud de los pelos radicales (Koltai et al., 2010; Ruyter-Spira et al., 2011).

Otro tipo de molécula señal que puede estar involucrado en esta primera etapa de reconocimiento son los flavonoides, tal y como ocurre en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Sin embargo, el efecto que estos compuestos ejercen sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos MA en la fase presimbiótica no está claro, ya que se ha descrito que un mismo flavonoide puede ejercer efectos positivos o negativos en diferentes hongos (Requena et al., 2007).

Al igual que el hongo reacciona ante la presencia de una planta hospedadora, también esta se prepara para el establecimiento de la simbiosis. Así, en presencia del hongo se inicia un programa de desarrollo que es, en parte, similar al desencadenado para la formación de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Se ha observado que determinados mutantes de leguminosas afectados en la nodulación también tienen alterada la formación de micorrizas (Balaji et al., 1994; Albrecht et al., 1998; Chabaud et al., 2002). En este sentido se ha comprobado que las moléculas señal producidas por los hongos MA, denominadas de forma colectiva como factores *Myc*, son capaces de activar genes de la planta, como el gen *Enod11* de leguminosas y otros implicados en la transducción de señales (Kosuta et

al., 2003; Weidmann et al., 2004). Recientemente se ha identificado la naturaleza molecular de estas señales, consistente en una mezcla de lipoquito-oligosacáridos (LCOs, de sus siglas en inglés) sulfatados y no sulfatados, los cuales poseen una estructura molecular similar a los factores *nod* producidos por los rizobios (Maillet et al., 2011). Por otra parte, se ha observado que los hongos MA son capaces de producir señales difusibles que retrasan algunas respuestas de la planta como la formación de raíces laterales (Oláh et al., 2005), o la acumulación de almidón en la raíz (Gutjahr et al., 2009, 2011), el cual decrece tras la colonización como resultado de la transferencia de carbono hacia el hongo.

Por analogía con lo que ocurre en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Oldroyd y Downie, 2006), se ha propuesto que el  $\text{Ca}^{+2}$  podría estar involucrado en la transducción de señales en las MA. Utilizando plantas de *Medicago truncatula* transformadas con el gen reportero de  $\text{Ca}^{+2}$  *camaleon* se ha observado que, al igual que ocurre en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, los hongos MA inducen cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmáticos (Kosuta et al., 2008) y nucleares (Chabaud et al., 2011) en las células epidérmicas cercanas a los puntos de contacto entre el hongo y la planta. Estas oscilaciones, en la mayoría de los casos, se producen antes de que el hongo MA contacte directamente con la planta, por lo que se ha propuesto que podrían preparar las células de la epidermis para la colonización. En este sentido, un trabajo reciente de Campos-Soriano y colaboradores (2011) ha propuesto como marcador de la fase presimbiótica de la colonización en arroz el gen *OsCPK18*, una proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  que se induce en el córtex radical como respuesta a la inoculación con *G. intraradices*.

### 1.1.2.2 Fase simbiótica

Una vez que el hongo MA contacta con la superficie de la raíz forma una estructura de precolonización llamada apresorio o hifopodio, a través del cual entrará en la raíz. Estudios transcriptómicos de los hongos MA durante la formación del apresorio sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  podría actuar como segundo mensajero en la transmisión de las señales que el hongo recibe de la planta

(Breuninger y Requena, 2004). A nivel de la planta, y como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que en las células epidérmicas en contacto con el apresorio se producen cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que son esenciales para que se produzca la colonización (Chabaud et al., 2011).

Tras la formación del apresorio se forma una especie de protuberancia que penetra y atraviesa las células epidérmicas, y que está siempre rodeada por la membrana plasmática de la célula hospedadora, evitándose así que la pared del hongo y el citoplasma de la célula vegetal entren en contacto (Genre y Bonfante, 2007). Antes de que el hongo penetre en la raíz se produce una importante reorganización celular que, mediante la fusión de cisternas de retículo endoplasmático y la reordenación del citoesqueleto, da lugar a la formación del denominado aparato de pre-penetración (PPA, del inglés *pre-penetration apparatus*), una especie de túnel transcelular a través del cual la hifa penetra en la raíz (Genre et al., 2005).

Una vez que el hongo ha atravesado la epidermis y llega al córtex, comienza a crecer a lo largo del eje de la raíz, de forma inter- y/o intracelular. El patrón de crecimiento de las hifas dentro de la raíz varía en función de las especies implicadas, existiendo dos tipos morfológicos bien definidos: *Arum* y *Paris* (Smith y Smith, 1997). En las MA de tipo *Arum*, el más descrito en la bibliografía y más abundante en las plantas cultivadas, las hifas del hongo se extienden por los espacios intercelulares del córtex, produciendo a intervalos regulares ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican repetidamente, de forma dicotómica, en el interior de las células dando lugar a los característicos arbuscúlos. En las MA tipo *Paris* no existe colonización intercelular. Las hifas se extienden pasando de célula a célula, formando bucles (*coils*) a partir de los cuales se producen los arbuscúlos. Sin embargo, esta distinción morfológica no es tan clara, produciéndose a menudo colonizaciones intermedias (Dickson, 2004). Finalmente, algunos hongos micorrícicos, fundamentalmente miembros de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, forman vesículas en el interior de la raíz. Estas contienen glóbulos lipídicos y funcionan como estructuras de reserva del hongo (Smith y Gianninazzi-Pearson, 1988).

La formación de los arbuscúlos supone una profunda reorganización de la célula que los aloja, lo que se manifiesta, principalmente, por la proliferación del plasmalema (que rodea todas y cada una de las hifas del hongo) y la deformación del protoplasto para acomodar al arbuscúlo. En este proceso, de forma similar a lo que ocurre durante la formación del PPA, se produce una reordenación del citoesqueleto que desplaza el núcleo a una posición central y provoca la fragmentación de la vacuola (Genre et al., 2008). Así mismo, se observa una menor heterocromaticidad del núcleo, lo que indica una mayor actividad transcripcional (Balestrini et al., 1992). Adicionalmente se produce una proliferación de plastidios que se disponen formando una red plastidial alrededor del arbuscúlo (Strack y Fester, 2006). En ellos tienen lugar numerosas actividades biosintéticas, incluidas las implicadas en la producción de los apocarotenoides que se acumulan específicamente en raíces micorrizadas (Walter et al., 2007).

Todas las estructuras intracelulares del hongo quedan aisladas del citoplasma de la célula hospedadora mediante la membrana plasmática, que se invagina a medida que el hongo crece y que, a nivel de los arbuscúlos, recibe el nombre de membrana periarbuscular. En las células colonizadas por arbuscúlos la superficie de contacto entre ambos simbioses es muy elevada y las barreras físicas que separan la planta y el hongo, es decir, las paredes celulares, quedan reducidas a un mínimo. Es por ello por lo que se asume que el intercambio de nutrientes y señales entre ambos simbioses tiene lugar fundamentalmente a nivel de la interfase simbiótica arbuscular, que está constituida por la membrana periarbuscular, el espacio o matriz interfacial, la pared del hongo (muy reducida a nivel de las hifas más finas del arbuscúlo) y la membrana plasmática del hongo (Bonfante 2001; Ferrol et al., 2002a; Balestrini y Bonfante, 2005). La membrana periarbuscular, aunque es continua con la membrana plasmática, posee una composición proteica diferente, tal como revela la presencia de transportadores específicos en ella (Harrison et al., 2002; Pumplin y Harrison, 2009; Kobae et al., 2010a, 2010b). Análisis ultraestructurales de la matriz interfacial indican la presencia de moléculas características de la pared celular primaria de la planta, incluyendo  $\beta$ -1,4-glucanos, poligalacturonanos no esterificados, xiloglucanos, proteínas ricas en hidroxiprolina y arabinogalactanos

(Bonfante y Perotto, 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996). Por otro lado, la naturaleza ácida de la matriz interfacial (Guttenberger 2000), resultado de la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas de ambos simbioses (Ferrol et al., 2000, 2002b; Gianinazzi-Pearson et al., 2000; Krajinski et al., 2002; Requena et al., 2003), genera un gradiente de potencial electroquímico con respecto al citoplasma de los simbioses que, probablemente, favorece los procesos de transporte de nutrientes (Smith et al., 2001; Ferrol et al., 2002c, Requena et al., 2003).

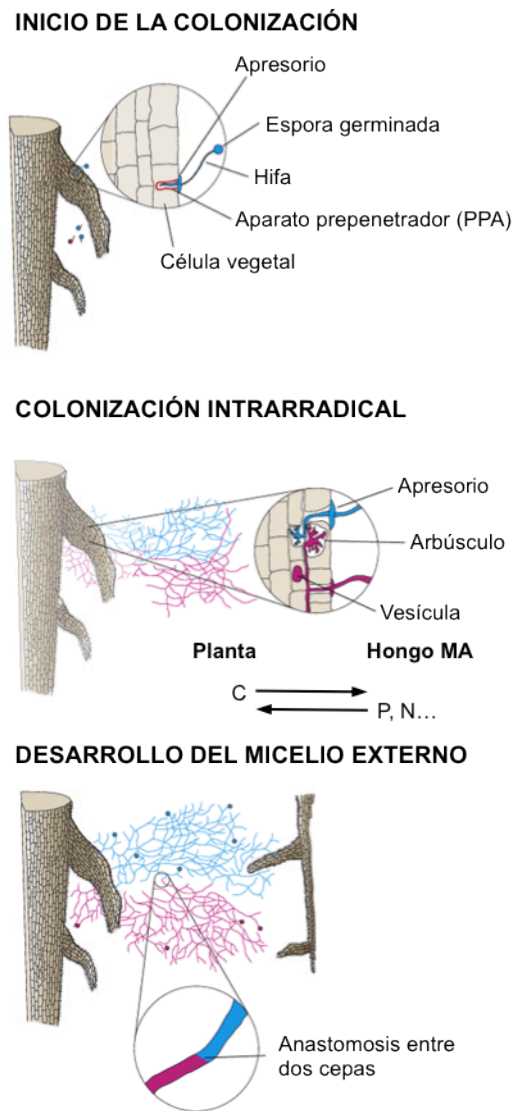
La vida media de los arbusculos es muy breve, entre 8 y 9 días (Alexander et al., 1989; Javot et al., 2007). Transcurrido este tiempo, los arbusculos colapsan y degeneran, volviendo la célula que los albergaba a su estado original. Una misma célula puede acoger durante su vida colonizaciones sucesivas (Bonfante-Fasolo 1984). No se conocen los mecanismos que regulan la degeneración de los arbusculos, ni si estos están controlados por la célula hospedadora o forman parte de la dinámica de crecimiento del hongo.

Como se ha comentado anteriormente, el uso de plantas leguminosas mutantes defectivas en el establecimiento de la simbiosis con *Rhizobium* ha permitido identificar genes de la planta esenciales para que se produzca la micorrización y establecer la existencia de una ruta de señalización común a ambos tipos de simbiosis, la llamada ruta simbiótica o *sym* (Parniske 2008). En *M. truncatula*, los genes DMI1, DMI2 y DMI3, que controlan la principal vía de señalización de los factores *nod*, son también esenciales para la formación de las MA (Parniske 2008). Concretamente, se ha observado que la formación del PPA y la inducción de las oscilaciones nucleares de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a los hongos MA requieren de la activación de esta ruta *sym* de señalización (Siciliano et al., 2007; Chabaud et al., 2011).

Simultáneamente a la colonización intrarradical, el hongo desarrolla en el suelo una extensa red de micelio que explora y explota los diferentes microhábitats del mismo en busca de nutrientes minerales y agua, parte de los cuales cederá a la planta. Debido al carácter de simbioses obligados de los hongos MA, el estudio de este micelio, denominado micelio externo o extrarradical, ha sido bastante complicado. El desarrollo en 1988 por Bécard

y Fortin de cultivos monoxénicos de los hongos MA facilitó en cierta medida esta labor. Estos cultivos permiten el establecimiento de micorrizas entre raíces transformadas de plantas micotróficas y determinados hongos micorrícicos, en placa de Petri con un medio sintético bien definido. Esta aproximación *in vitro*, aunque artificial, ha permitido una mejor observación del micelio externo. Inicialmente, los hongos MA desarrollan unas hifas relativamente gruesas, denominadas hifas exploradoras, que crecen con una marcada dominancia apical y que son las responsables del avance del micelio y de la extensión de la colonia fúngica. Estas hifas exploradoras producen ramificaciones de forma periódica (hifas secundarias), que a su vez vuelven a ramificarse sucesivamente dando lugar a hifas terciarias, cuaternarias, etc.. La vida media de los diferentes tipos de hifas es variable, siendo mayor la de las hifas más gruesas, ya que constituyen el armazón de la red de micelio (Bago et al., 1998a; Staddon et al., 2003). Sobre las hifas se desarrollan, a intervalos regulares, unas estructuras muy ramificadas que, en cierta medida, recuerdan a los arbuscúlos y que se denominan estructuras ramificadas de absorción (BAS, del inglés *branched absorbing structures*), cuya hipotética función es la absorción de nutrientes del medio (Bago et al., 1998b; Bago 2000). Esta hipótesis está respaldada por las modificaciones estructurales que ocurren a nivel de los BAS: una disminución progresiva del grosor de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que facilitaría la absorción de nutrientes, y un aumento en el número de mitocondrias en la base del mismo, que aumentaría la disponibilidad de energía para el transporte (Bago et al., 1998b). Los BAS son estructuras transitorias y al cabo de unos 21 días retraen su contenido citoplasmático, a menos que desarrollen esporas. Estas esporas, en función de la especie del hongo MA, pueden desarrollarse de forma aislada (como en *G. intraradices*) o agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpos (como en *G. mosseae*), cerrándose de este modo el ciclo de vida de los hongos MA [Figura 2].

El micelio extrarradical de los diferentes hongos MA presenta patrones de crecimiento y frecuencias de anastomosis y ramificación que difieren de unas especies a otras. Posiblemente estas diferencias reflejen las diferentes estrategias de exploración y ocupación de los diferentes nichos del suelo.



**Figura 2. Ciclo de vida de los hongos MA.** Adaptado de Denison y Kiers (2011).

La mayoría de las especies pertenecientes al género *Glomus* forman grandes redes de micelio, altamente ramificadas y con gran número de anastomosis. Estas redes de micelio son más resistentes a las perturbaciones del suelo que el micelio de especies de los géneros *Scutellospora* o *Gigaspora*, las cuales desarrollan largas hifas que, probablemente, son capaces de explorar regiones más distantes de la raíz (de la Providencia et al., 2005; Voets et al., 2006). La mayoría de la biomasa fúngica en los miembros de la

familia Gigasporaceae se encuentra en el exterior de la raíz colonizada, es decir, como micelio externo, mientras que en los miembros de la familia Glomeraceae la relación micelio interno : micelio externo es mayor (Maherali y Klironomos, 2007).

Cabe destacar que, a diferencia del micelio intrarradical, que se encuentra protegido por los tejidos de la raíz de la planta, el micelio externo, al desarrollarse directamente en el suelo, se encuentra mucho más expuesto a las condiciones ambientales y a la acción de otros microorganismos del suelo. Con ellos va a desarrollar una serie de interacciones de gran importancia para el desarrollo de las plantas, el equilibrio de las poblaciones microbianas, la formación de agregados estables en el suelo y, por tanto, para el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de los sistemas suelo-planta (Jeffries y Barea, 2001; Smith y Read, 2008).

### **1.1.3 Bases moleculares de la nutrición en MA**

El funcionamiento de la simbiosis MA está basado fundamentalmente en el intercambio bidireccional de nutrientes entre el hongo y la planta. Este intercambio de nutrientes tiene lugar a nivel de las interfases simbióticas que se desarrollan en el interior de una raíz colonizada, especialmente, a nivel de los arbusculos, que es donde, como se ha indicado anteriormente, las barreras físicas entre ambos simbioses quedan reducidas a un mínimo. La transferencia de nutrientes implica dos procesos de transporte: 1) el eflujo de los nutrientes desde el organismo donador hacia la matriz interfacial, y 2) la absorción de los nutrientes por el organismo receptor desde la matriz interfacial. Aunque la composición y estructura de la matriz interfacial pueden afectar la transferencia de nutrientes entre los simbioses, este proceso está controlado fundamentalmente por las proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática de ambos organismos.

A continuación se resumen los mecanismos implicados en la absorción de nutrientes minerales por el hongo, en especial de fósforo, así como en el intercambio de dichos nutrientes por hidratos de carbono procedentes de la



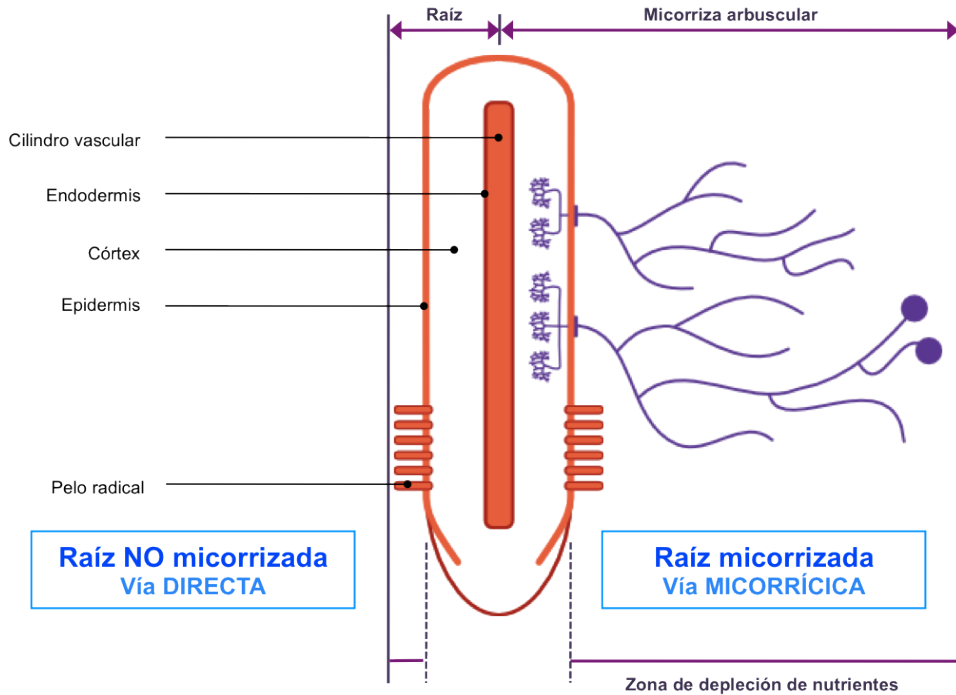
planta. La revisión bibliográfica de los conocimientos actuales sobre micorrizas arbusculares y N se presentarán en el Apartado 3 de la Introducción, una vez que se hayan revisado los sistemas de transporte de N en plantas y hongos.

### **1.1.3.1 Adquisición de nutrientes minerales desde el suelo y transferencia a la planta**

Tradicionalmente, el transporte y la transferencia de Pi se ha considerado el proceso fisiológico clave por el cual los hongos MA mejoran el crecimiento vegetal (Barea et al., 2008; Ferrol y Pérez-Tienda, 2009), pero cada vez son mayores las evidencias que indican que los hongos MA juegan un importante papel en la nutrición nitrogenada de la planta (Veresoglou et al., 2012), así como en la absorción de otros nutrientes de baja movilidad en el suelo como el Cu o el Zn (Clark y Zeto, 2000). A cambio la planta le cede al hongo compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis.

Como se ha indicado anteriormente, el micelio extrarradical actúa como una extensión de la raíz ayudando a la planta a absorber nutrientes de baja movilidad en el suelo, fundamentalmente Pi. En la solución del suelo, el Pi está presente en forma de ortofosfato, el cual es rápidamente secuestrado por los cationes presentes en suelo, especialmente en condiciones ácidas. La movilidad de estas sales de fosfato es muy baja, por lo que la absorción por la planta consume rápidamente el P presente en la zona de influencia de las raíces, creándose zonas de agotamiento o depleción en este nutriente alrededor de las mismas (Barea et al., 2007; Bucher, 2007). El desarrollo del micelio extrarradical en el suelo aumenta considerablemente la superficie de absorción de las plantas micorrizadas, superando las zonas de depleción de nutrientes y accediendo a lugares donde las raíces no pueden acceder (Smith y Read, 2008). Por esta razón, se considera que en plantas micorrizadas coexisten dos vías de absorción de nutrientes: la vía directa llevada a cabo por las células epidérmicas y la vía indirecta o micorrícica mediante las hifas del hongo (Smith y Smith, 2012). En la vía directa de absorción de nutrientes están implicados los distintos transportadores de nutrientes expresados en las células epidérmicas de la raíz. En la vía indirecta o micorrícica están

implicados los transportadores de nutrientes fúngicos expresados en el micelio externo y los transportadores de nutrientes de la planta expresados en la interfase simbiótica establecida entre el hongo y la planta [Figura 3].



**Figura 3.** Vías de absorción de nutrientes en plantas micorrizadas.

A pesar de la importancia del micelio externo en la adquisición de los nutrientes minerales presentes en la solución edáfica, son pocos los transportadores de hongos MA caracterizados hasta la fecha. Entre ellos se encuentran varios transportadores de fosfato de diferentes hongos (*GvPT*, *GintPT* y *GmosPT*, de *G. versiforme*, *G. intraradices* y *G. mosseae*, respectivamente) (Harrison y van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005), un transportador de amonio de *G. intraradices* (*GintAMT1*, López-Pedrosa et al., 2006;), una acuaporina (*GintAQP1*, Aroca et al., 2009) y un transportador de nitrato (*GintNRT*, Tian et al., 2010). Además, se han identificado varios genes que codifican la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática en *G. mosseae* (Ferrol et al., 2000; Requena et al., 2003), proteína responsable de generar el gradiente electroquímico necesario para

que se produzca el transporte iónico a través de las membranas biológicas. Con la reciente publicación del transcriptoma de *G. intraradices* se ha ampliado la información disponible sobre el número de transportadores que presenta, lo que abre una nueva etapa en la investigación del transportoma de los hongos MA (Tisserant et al., 2012).

Diferentes estudios transcriptómicos, en distintas especies de plantas colonizadas por diferentes hongos, han puesto de manifiesto que los hongos MA son capaces de alterar la expresión de diferentes transportadores de nutrientes en las raíces de la planta hospedadora (Frenzel et al., 2005; Güimil et al., 2005; Hohnjec et al., 2005; Deguchi et al., 2007; Gomez et al., 2009; Guether et al., 2009a; Benedito et al., 2010; Casieri et al., 2012; Gaude et al., 2012; Ruzicka et al., 2012). La inducción o la expresión específica en raíces micorrizadas de diferentes transportadores evidencia la posible existencia de diferentes vías de absorción micorrícica para diferentes nutrientes minerales, así como la modulación de la vía directa de absorción de los mismos.

La existencia de estas dos vías de transporte en plantas micorrizadas se pone de manifiesto claramente en el caso del Pi (Smith et al., 2003), donde la vía micorrícica puede ser responsable del 100% de la incorporación de Pi en algunas especies vegetales (Smith et al., 2004). La vía micorrícica de absorción para el Pi empieza con el transporte activo de Pi a través de los transportadores de alta afinidad de Pi del micelio extrarradical del hongo (Harrison y van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005). El Pi absorbido por el micelio extrarradical se almacena fundamentalmente en las vacuolas, para evitar un aumento de la presión osmótica y mantener el flujo de Pi. En las vacuolas el Pi se polimeriza rápidamente formando cadenas de polifosfatos (poliP) (Ezawa et al., 2004; Tani et al., 2009). Las cadenas de poliP, estabilizadas con cationes ( $K^+$  o  $Mg^{2+}$ ; Ryan et al., 2003) o con otros compuestos cargados positivamente como la arginina ( $Arg^+$ ; Jin et al., 2005), son translocadas hacia el micelio intrarradical en vacuolas tubulares asociadas a los microtúbulos del citoesqueleto que dirigen las corrientes citoplasmáticas (Olsson et al., 2002; Uetake et al., 2002; Bago et al., 2002a). Una vez en el interior de la raíz, el poliP es hidrolizado (Ohtomo y Saito, 2005), sale de la vacuola y posteriormente se libera a la

matriz interfacial que rodea al arbusculo, de donde es absorbido por la célula hospedadora mediante transportadores de Pi de la planta presentes en la membrana periarbuscular (PAM, del inglés *periarbuscular membrane*).

En diferentes especies vegetales se han identificado transportadores de Pi que se inducen específicamente durante la simbiosis, concretamente en células colonizadas por arbusculos. Estos transportadores son los responsables de la absorción de Pi por la planta a través de la vía micorrícica (Harrison et al., 2002; Paszkowski et al., 2002; Nagy et al., 2005; Maeda et al., 2006). A modo de ejemplo, el transportador MtPT4 de *M. truncatula* se expresa específicamente en raíces micorrizadas y está localizado en la membrana periarbuscular. Su estudio funcional reveló que tiene baja afinidad por el Pi y que presenta una actividad transportadora óptima en condiciones ácidas (Harrison et al., 2002), a valores de pH similares a los descritos para la matriz interfacial (Guttenberger 2000). Es de destacar que, simultáneamente, determinados transportadores de las células epidérmicas, responsables de la vía directa de absorción, a menudo se inhiben durante el desarrollo de la simbiosis (Versaw et al., 2002; Hohnjec et al., 2005). Estos resultados indican que la activación de la vía micorrícica de absorción de nutrientes induce una inhibición de la vía directa.

La utilización de mutantes de pérdida de función ha proporcionado nuevas herramientas para la caracterización funcional de los genes que codifican transportadores de fosfato. El primer estudio reveló la redundancia de estos genes en especies de la familia Solanaceae, en particular en tomate (Nagy et al., 2005), no permitiendo un estudio en profundidad (Xu et al., 2007). Por este motivo, se llevaron a cabo nuevos estudios utilizando leguminosas, en las que hay una nula o baja redundancia génica. Usando líneas transgénicas de *M. truncatula* en las que sólo un transportador específico de la simbiosis, MtPT4, fue silenciado por ARN de interferencia (ARNi) o bloqueado mediante mutagénesis clásica, Javot y colaboradores (2007) demostraron que MtPT4 es esencial para la absorción de Pi a partir del hongo en plantas micorrizadas. Resultados similares se obtuvieron al silenciar el gen LjPT3 de *Lotus japonicus* que también se expresa específicamente en células colonizadas por arbusculos (Maeda et al.,

2006). La colonización intrarradical de estos mutantes defectivos en MtPT4 o LjPT3 se reducía notablemente, indicando que el transporte de Pi es crítico para el desarrollo de la simbiosis (Maeda et al., 2006; Javot et al., 2007). Estos resultados sugieren que la absorción de Pi por la planta a través de la interfase simbiótica sirve como señal que permite el desarrollo de los arbusculos y, consecuentemente, del hongo en la raíz. Por otra parte, la capacidad del hongo de absorber y transferir Pi a la planta está regulada por la transferencia de C desde la planta (Bücking y Shachar-Hill, 2005). Finalmente, la expresión de GmosPT (Ballestrini et al., 2007; Gómez-Ariza et al., 2009) y GintPT (Tisserant et al., 2012) en células arbusculadas sugiere que, en esa interfase simbiótica, la absorción de Pi ocurre probablemente de forma competitiva, pudiendo ejercer el hongo cierto control sobre la cantidad de fósforo que absorbe la planta (Kiers et al., 2011).

### **1.1.3.2 Transferencia de carbono desde la planta**

La primera evidencia experimental sobre la transferencia de compuestos carbonados desde la planta al hongo fue proporcionada por Ho y Trappe (1973), quienes usando  $^{14}\text{CO}_2$  demostraron que, tras unas semanas, se detectaba C marcado en el micelio del hongo. El carácter de simbiotes estrictos de los hongos MA, junto con la dificultad para aislar sus estructuras intrarradicales, ha complicado en gran medida el estudio de los mecanismos implicados en la transferencia de los compuestos carbonados desde la planta hacia el hongo.

El uso de sustratos marcados radiactivamente ha mostrado que los hongos MA son capaces de absorber carbohidratos a partir de la planta en forma de hexosas, preferentemente glucosa (Shachar-Hill et al., 1995; Solaiman y Saito, 1997). Sin embargo, los mecanismos implicados y el lugar donde tiene lugar la transferencia apenas empiezan a desvelarse. Hasta hace poco se creía que el micelio extrarradical era incapaz de absorber hexosas, aunque sí podía utilizar acetato o glicerol como fuente de carbono (Pfeffer et al., 1999). Recientemente, Helber y colaboradores (2011) han observado, usando también sustratos marcados radiactivamente, que el micelio extrarradical sí que es capaz de absorber glucosa y xilosa, y que esta

absorción transcurre por un mecanismo de transporte activo. Sin embargo, la radiactividad no se detecta en las raíces, lo que sugiere que los azúcares tomados por el micelio externo son retenidos para el propio uso del hongo.

Puesto que la sacarosa es la principal forma en la que se transportan los fotoasimilados, la utilización de la misma como fuente de energía, tanto por las raíces como por los hongos micorrícicos, requiere que esta sea hidrolizada en glucosa y fructosa. Esto ocurre mediante la acción de invertasas y/o sacarosa sintasas, enzimas que están implicadas en el transporte de la sacarosa a larga distancia y en su metabolismo (Sturm y Tang, 1999). Se ha demostrado que la micorrización altera la expresión de algunos genes que codifican estas enzimas en plantas de trébol (Wright et al., 1998), *Phaseolus vulgaris* (Blee y Anderson, 2002), maíz (Ravnskov et al., 2003), *M. truncatula* (Hohnjec et al., 2003) y tomate (Schaarschmidt et al., 2006; García-Rodríguez et al., 2007). Estos datos sugieren que estas enzimas proveen de metabolitos (hexosas) a las células colonizadas para satisfacer la demanda del hongo y mantener la mayor actividad metabólica asociada a la micorrización. Estas enzimas estarían indirectamente involucradas en el mantenimiento de un flujo de sacarosa desde los tejidos fuente (generalmente las hojas) hacia la raíz micorrizada que actúa de sumidero. Trabajos posteriores han puesto de manifiesto que el suministro de carbono de la planta al hongo y el normal desarrollo de la micorrización depende de la actividad de las invertasas apoplásticas (Schaarschmidt et al., 2007a, 2007b; Schaarschmidt y Hause, 2008). Por otro lado, Baier y colaboradores (2010), mediante el uso de líneas mutantes de *M. truncatula*, han demostrado que el gen MtSucS1, que codifica una sacarosa sintasa específica de raíces micorrizadas (Hohnjec et al., 2003), es necesario para la correcta maduración y mantenimiento de los arbusculos.

El mecanismo por el cual los azúcares pasan a las interfases simbióticas aún se desconoce. Hasta ahora existen pocas evidencias moleculares de la presencia de transportadores en la membrana de las células vegetales en contacto con las interfases simbióticas que puedan exportar azúcares. Sin embargo, se ha observado que la micorrización induce la expresión de algunos genes que codifican transportadores de hexosas en raíces de *M.*

*truncatula* (Harrison 1996; Liu et al., 2003; Hohnjec et al., 2005). De estos transportadores el mejor caracterizado es MtST1, el cual se expresa tanto en células colonizadas por arbúsculos como en células adyacentes no colonizadas. Este transportador está implicado en la absorción de hexosas mediante un proceso de simporte con protones, lo que sugiere su implicación para mantener la mayor actividad metabólica asociada a la micorrización (Harrison 1996). Este hecho sugiere que tanto la planta como el hongo compiten por las hexosas presentes en las interfases simbióticas, por lo que la planta ejerce algún tipo de control sobre la cantidad de C que drena hacia el hongo. Por otro lado, también se ha observado la activación transcripcional de transportadores de hexosas en raíces micorrizadas de maíz (Wright et al., 2005) y en hojas de plantas de tomate micorrizadas (García-Rodríguez et al., 2005). La inducción de transportadores de azúcares en hojas de plantas micorrizadas sugiere que la micorrización regula el flujo de azúcares desde los tejidos fuente hacia los sumideros. Un mecanismo alternativo, propuesto por Bago y colaboradores (2000) que explicaría la transferencia de azúcares hacia las interfases simbióticas sería la difusión pasiva a través de las membranas celulares en contacto con el hongo o bien siguiendo directamente la vía apoplástica.

Como se ha mencionado previamente, el lugar y los mecanismos por los que tiene lugar la transferencia de carbono desde la planta al hongo apenas empiezan a desvelarse. Recientemente Helber y colaboradores (2011) han identificado y caracterizado un transportador de monosacáridos del hongo capaz de absorber un amplio espectro de sustratos carbonados: glucosa, xilosa, manosa y fructosa, en orden de afinidad decreciente. Este transportador (MST2) se expresa tanto en arbúsculos, como en hifas intercelulares y actúa como un transportador de alta afinidad para glucosa, dependiente de un transporte secundario de  $H^+$  con un pH óptimo de 5, similar al pH de la matriz interfacial establecida entre el hongo y la planta (Guttenberger 2000). La presencia de otros azúcares en la matriz interfacial, derivados de la pared celular vegetal, y la versatilidad de este transportador sugiere que estos azúcares puedan constituir otros recursos carbonados para el hongo que pueden competir con la glucosa. La expresión de este gen en la interfase simbiótica está fuertemente correlacionada con la expresión de los

genes de la planta que codifican para transportadores de fosfato específicos de la simbiosis (MtPT4 y StPT4), lo que sugiere que su expresión pueda estar regulada por la homeostasis de fosfato en la raíz (Helber et al., 2011). Por otro lado, los mismos autores han demostrado que la expresión de este transportador se induce fuertemente en el micelio extrarradical en presencia de xilosa, lo que sugiere que en el interior de la raíz la xilosa pueda ser el desencadenante de la expresión de MST2. Además, utilizando una novedosa técnica de silenciamiento génico (HIGS, del inglés *Host-Induced Gene Silencing*) se ha observado que MST2 es crítico para el correcto desarrollo de la simbiosis.

Tras su absorción por el hongo, los monosacáridos son rápidamente transformados en trehalosa y glucógeno, o son metabolizados por la vía de las pentosas fosfato, con el fin de disminuir la osmolaridad y mantener los gradientes en una concentración favorable a la transferencia (Shachar-Hill et al., 1995). Parte de estos carbohidratos son transformados en compuestos lipídicos (triacilglicéridos) en el micelio intrarradical y posteriormente serán transportados al micelio extrarradical en donde, mediante gluconeogénesis, se transformarán en carbohidratos (Pfeffer et al., 1999; Bago et al., 2002b). Además, Bago y colaboradores (2003) observaron que una pequeña cantidad de glucógeno se transfiere desde el micelio interno al externo. En los hongos MA se produce una compartimentación del metabolismo, de forma que la biosíntesis lipídica sólo reside en el micelio interno, mientras que la gluconeogénesis se localiza únicamente en el micelio extrarradical. Esta marcada polarización del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría estar en la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.



## 2. El nitrógeno en la biosfera

El N, tras el O, H y C, es el elemento más abundante en los seres vivos, siendo un nutriente mineral esencial, y a menudo limitante, para su crecimiento. Este elemento forma parte de compuestos esenciales tales como aminoácidos, amidas, proteínas, nucleótidos, coenzimas y numerosos metabolitos secundarios.

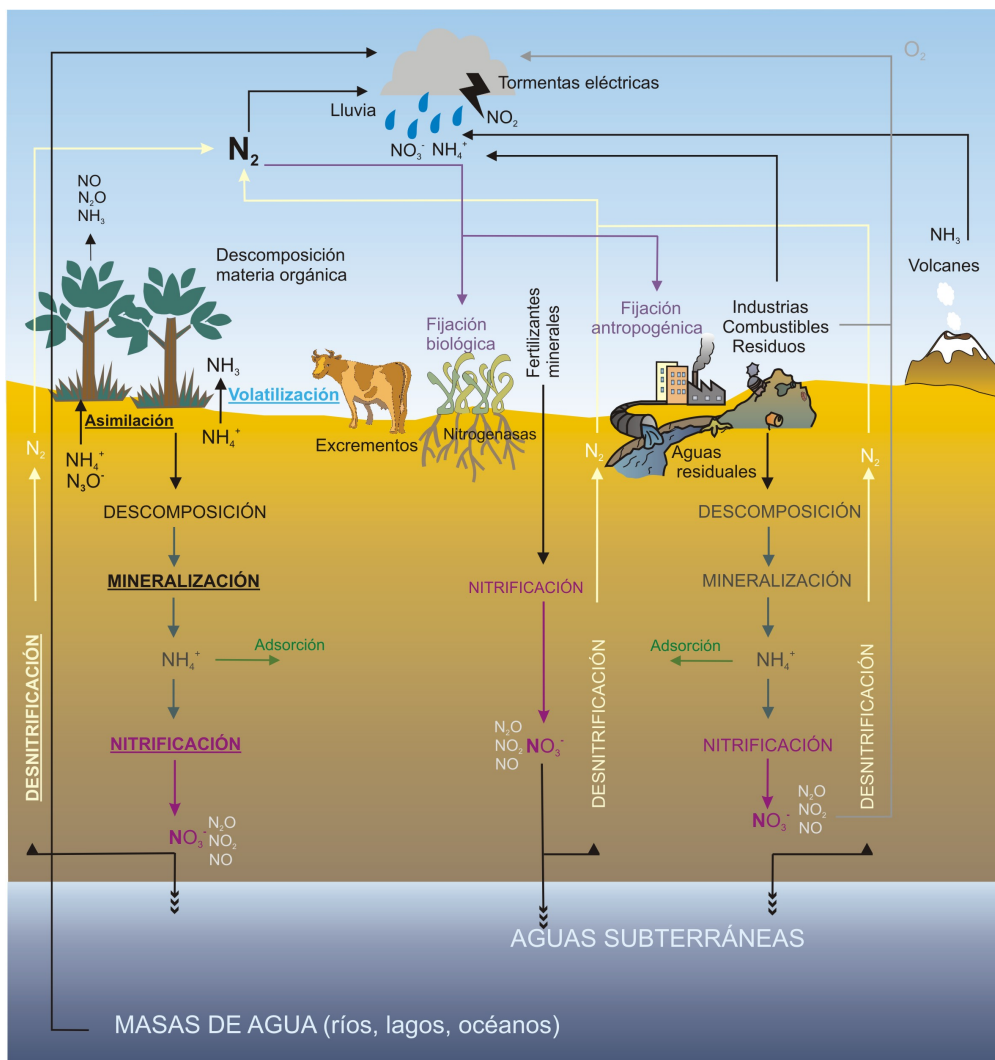


Figura 4. Ciclo biogeoquímico del N. Tomada de <http://www.miliarium.com>

A pesar de que el 80% de la atmósfera está compuesta por N, este no está disponible para la mayoría de los organismos. Tal como se representa en la Figura 4, el N<sub>2</sub> atmosférico es fijado en forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por determinados microorganismos del suelo en un proceso denominado fijación biológica del N (FBN). Esta se puede llevar a cabo tanto por bacterias de vida libre (p. ej., *Azotobacter*, *Azospirillum*, ...) como por bacterias que forman simbiosis con determinadas plantas (p. ej., *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, ...). Los microorganismos descomponedores (bacterias y hongos) extraen NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de la biomasa presente en el suelo en un proceso denominado amonificación. El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del suelo puede ser absorbido directamente por plantas y microorganismos, o puede ser oxidado hasta NO<sub>2</sub><sup>-</sup> o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en un proceso denominado nitrificación que llevan a cabo un grupo de bacterias denominadas bacterias nitrificantes (p. ej., *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, ...). El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede ser asimilado por plantas y microorganismos o puede ser utilizado como sustrato de un grupo de bacterias, las bacterias desnitrificantes (p. ej., *Pseudomonas*, ...), que van a devolver el N en forma de N<sub>2</sub> a la atmósfera.

En el suelo, el N se encuentra presente como una compleja mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos, que se caracterizan por una marcada y heterogénea distribución y cuya disponibilidad fluctúa enormemente de forma estacional debido a factores como las precipitaciones, temperatura, viento, tipo de suelo y pH. Debido a estos factores se estima que entre el 50 y 70% del nitrógeno aportado al suelo se pierde por lixiviación o desnitrificación (Hodge et al., 2000). Para las plantas, los iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> son las principales fuentes de N inorgánico disponibles para su nutrición. La forma de N absorbida va a depender de las condiciones del suelo y de las preferencias concretas de la especie vegetal (Marschner, 1995; Miller y Cramer, 2004). En general, las plantas adaptadas a crecer en suelos poco aireados y con valores de pH bajos tienden a absorber NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mientras que las adaptadas a crecer en suelos aireados y con altos valores de pH van a utilizar preferentemente NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Maathuis, 2009). En contraste con el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, los compuestos orgánicos de N (aminoácidos, oligopéptidos, ...) son poco móviles, aunque constituyen también una importante fuente de N (Miller y Cramer, 2004; Jämtgård et al., 2008). Por otra parte, los hongos utilizan

preferente  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N inorgánico, aunque algunos pueden asimilar y utilizar también el  $\text{NO}_3^-$ .

Dado que la presente Memoria de Tesis Doctoral ha tenido como objetivo la caracterización y el estudio de los sistemas de transporte de  $\text{NH}_4^+$  en MA, en este apartado de la Introducción nos vamos a centrar preferentemente en el ion  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N para plantas y hongos.

### **2.1 El amonio como fuente de N para plantas y microorganismos**

El  $\text{NH}_4^+$  desempeña un papel clave en el metabolismo del N en la mayoría de los seres vivos. Muchos organismos, especialmente bacterias y microorganismos eucariotas, prefieren el  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N. Esto es debido a que su absorción y asimilación requiere un menor gasto energético que otras fuentes de N, que deben transformarse en  $\text{NH}_4^+$  antes de poder ser utilizadas en las diferentes rutas metabólicas (Marzluf 1996).

Por lo general, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en los suelos agrícolas oscila entre 20 y 200  $\mu\text{M}$ , siendo entre unas 50 y 250 veces menor que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  (Owen y Jones, 2001). El  $\text{NH}_4^+$  es relativamente inmóvil en el suelo y, en consecuencia, sufre menos pérdidas por lixiviación que el  $\text{NO}_3^-$ . Por otro lado, valores bajos de pH y temperatura, la acumulación de compuestos alelopáticos de base fenólica, el encharcamiento y la falta de aireación del suelo inhiben la nitrificación y provocan una acumulación de  $\text{NH}_4^+$  (Britto y Kronzucker, 2002). Además, la actividad agrícola/ganadera e industrial provoca en determinados suelos la acumulación de importantes cantidades de  $\text{NH}_4^+$ . En estos casos, el  $\text{NH}_4^+$  pasaría a ser la forma de N predominante, con concentraciones que van desde 2 mM en algunos suelos forestales, hasta 20 mM en algunos suelos agrícolas (Britto y Kronzucker, 2002). Concentraciones elevadas de  $\text{NH}_4^+$  pueden resultar tóxicas para algunas especies, posiblemente debido a la disipación del gradiente de protones a través de las membranas biológicas, a la acidificación del medio externo como consecuencia del transporte de  $\text{NH}_4^+$ , o al desequilibrio en el balance ácido/base (Gerendás et al., 1997). En el caso de las plantas, los efectos tóxicos del exceso de  $\text{NH}_4^+$  pueden deberse

también a la ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . En efecto, además de ser un importante osmolito, el  $\text{NO}_3^-$  es un ion esencial para la translocación de cationes en el xilema y actúa como una señal que induce la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos y en la síntesis de almidón (Stitt, 1999), así como los de la mayoría de los que están relacionados con la absorción y asimilación de N (Wang et al., 2000, 2001, 2003; Scheible et al., 2004).

Durante décadas se pensó que los flujos de amonio a través de las membranas celulares no requerían sistemas de transporte específicos y que tenían lugar mediante difusión de  $\text{NH}_3$ . En solución acuosa, la forma protonada y desprotonada del amonio,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$  respectivamente, se encuentran en un equilibrio dependiente del pH, con un  $\text{pK}_a$  de 9.25. Esto implica que el  $\text{NH}_4^+$  va a ser la forma predominante en condiciones fisiológicas. A pH neutro, aproximadamente el 1% se encuentra en forma de  $\text{NH}_3$ . Diferentes estudios han revelado que las membranas lipídicas son relativamente impermeables al  $\text{NH}_4^+$ , mientras que son relativamente permeables al  $\text{NH}_3$ , por lo que en cualquier sistema biológico deben darse tanto la difusión del  $\text{NH}_3$  como el transporte específico del  $\text{NH}_4^+$ . Los diferentes gradientes electroquímicos y de pH a través de las membranas van a afectar al equilibrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ . Las plantas y algunos microorganismos acidifican el medio que los rodea y utilizan transportadores de  $\text{NH}_4^+$  de la membrana, para mantener una concentración interna de  $\text{NH}_3$  hasta 100 veces superior a la externa. Además del pH, el potencial de membrana y la actividad de los transportadores, las reacciones enzimáticas que generan o consumen  $\text{NH}_4^+$  también son importantes para mantener su concentración. Por ejemplo, en plantas y microorganismos, el  $\text{NH}_4^+$  es rápida y eficientemente asimilado por enzimas como la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato deshidrogenasa (GDH). Para mantener la concentración citoplasmática deseada, ya que concentraciones altas de  $\text{NH}_4^+$  resultan citotóxicas, y promover la asimilación de N y el crecimiento, las plantas y microorganismos han desarrollado sistemas de transporte altamente específicos y mecanismos de recuperación del  $\text{NH}_3$  perdido durante el metabolismo.

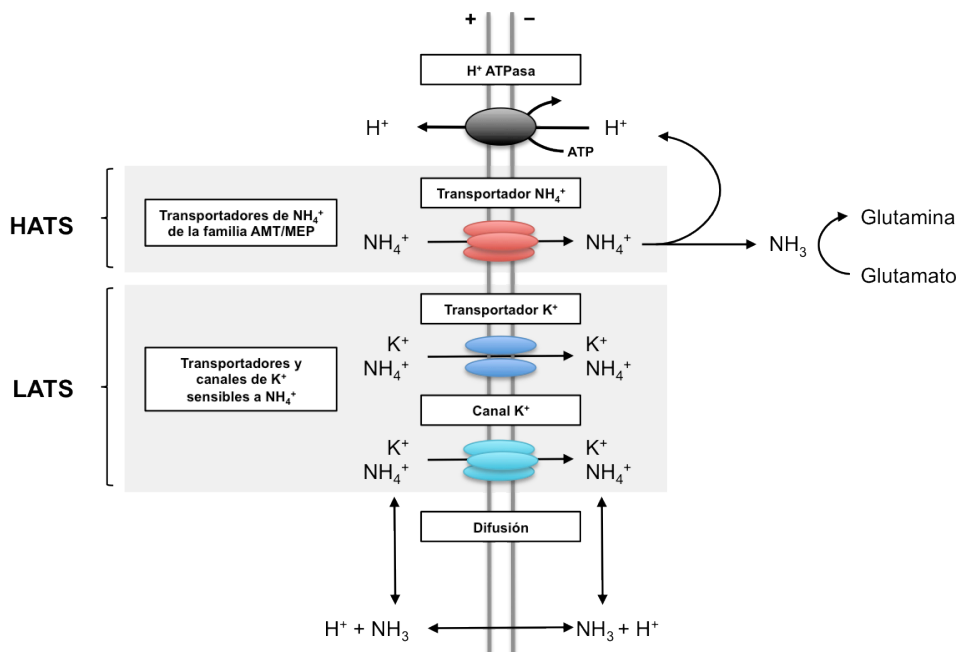
En los últimos años se ha logrado un avance espectacular en el conocimiento de los mecanismos de absorción de  $\text{NH}_4^+$ . Esto ha sido posible gracias al desarrollo de métodos fisiológicos que han permitido medir *in vivo* la tasa de influjo y eflujo de  $\text{NH}_4^+$ , así como el uso de técnicas moleculares y genéticas que han permitido identificar los genes responsables de su transporte.

### 2.1.1 Cinética de la absorción de amonio

La absorción neta o influjo de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana plasmática, tanto en raíces como en microorganismos, sigue por lo general un patrón bifásico en función de la concentración externa de  $\text{NH}_4^+$  ( $[\text{NH}_4^+]_o$ ). Esto sugiere la existencia de dos sistemas de transporte diferentes, uno de alta afinidad o HATS (del inglés, *High Affinity Transport System*) y otro de baja afinidad o LATS (del inglés, *Low Affinity Transport System*) (Rawat et al., 1999). El HATS sigue una cinética típica de Michaelis-Menten que opera a una concentración externa de  $\text{NH}_4^+$  inferior a 1 mM, mientras que el LATS sigue una cinética lineal (no saturable), compatible con los sistemas de transporte pasivo, que sólo es evidente cuando la concentración externa de  $\text{NH}_4^+$  es superior a 1 mM (Rawat et al., 1999; Sheldon et al., 2001). En la actualidad se acepta que el  $\text{NH}_4^+$ , más que el  $\text{NH}_3$ , es la forma transportada (Forde y Clarkson, 1999; von Wirén et al., 2001). A pesar de ello, el mecanismo preciso por el que tiene lugar el influjo de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana plasmática aún se desconoce.

Los requerimientos energéticos del transporte de  $\text{NH}_4^+$  difieren en función de que transcurra mediante HATS o LATS. Ambos sistemas de transporte son sensibles a inhibidores y desacopladores metabólicos, pero la inhibición ejercida por estos compuestos es mucho más pronunciada en el HATS, lo que sugiere que el LATS es menos dependiente de energía metabólica y/o el gradiente electroquímico transmembrana (Ullrich et al., 1984; Wang et al., 1993). Esto indica que tanto el HATS como el LATS difieren en sus mecanismos de absorción de  $\text{NH}_4^+$  y/o que parte de la actividad del LATS podría estar asociada a otros procesos. La cinética no saturable que presenta el LATS sugiere que el influjo de  $\text{NH}_4^+$  puede ocurrir

por difusión, aunque solamente a un pH externo elevado la difusión de  $\text{NH}_3$  podría contribuir de forma significativa. También se ha observado que determinadas acuaporinas son capaces de transportar  $\text{NH}_3$  (Nakhoul et al., 2001; Jahn et al., 2004), por lo que su aporte también podría contribuir al LATS. El transporte de  $\text{NH}_4^+$  mediado por el LATS también puede ocurrir a través de determinados canales y transportadores de  $\text{K}^+$  que de forma inespecífica transportan  $\text{NH}_4^+$  (Forde y Clarkson, 1999; von Wirén et al., 2001). En la Figura 5 se resumen los diferentes mecanismos por los que tiene lugar el transporte de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana plasmática.



**Figura 5. Posibles mecanismos para el transporte de  $\text{NH}_4^+$  de alta y baja afinidad.**

El influjo de  $\text{NH}_4^+$  de alta afinidad se llevaría a cabo por los miembros de la familia de transportadores de amonio (AMT) y es dependiente de un gradiente de  $\text{H}^+$  generado por la actividad de  $\text{H}^+$ -ATPasas en la membrana. Las proteínas responsables del influjo de  $\text{NH}_4^+$  de baja afinidad no se conocen, pero podrían estar implicados canales y transportadores de  $\text{K}^+$ , que de forma inespecífica son capaces de transportar  $\text{NH}_4^+$ . La difusión de  $\text{NH}_3$  a través de la membrana parece que no contribuiría significativamente al influjo, pero podría ser una importante ruta de eflujo. Del mismo modo, algunas acuaporinas son capaces de actuar como canales para el  $\text{NH}_3$ . Adaptado de Crawford y Forde (2002).

### 2.1.2 Transportadores de amonio

A finales de los años 70 se consiguió aislar, mediante el escrutinio de levaduras resistentes a metilamonio (un análogo estructural tóxico del  $\text{NH}_4^+$ ) una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* defectiva en el transporte de  $\text{NH}_4^+$ . Pero no fue hasta la década de los 90 cuando se consiguieron clonar los dos primeros genes que codificaban transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (MEP/AMT). La complementación de la cepa de levadura mutante mediante el uso de genotecas de *S. cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*, permitió aislar MEP1 (del inglés, *methylammonium permease*) en *S. cerevisiae* y AtAMT1;1 (del inglés, *ammonium transporter*) en *A. thaliana* (Marini et al., 1994; Ninnemann et al., 1994). Con el crecimiento exponencial de las bases de datos de genes, se han identificado desde entonces un gran número de transportadores de amonio (AMTs), estando presente en todos los dominios de la vida. Además, frecuentemente, en un mismo organismo están presentes múltiples copias de estos genes. Por ejemplo, se han encontrado dos o más genes AMTs en muchas bacterias y arqueas, tres en *S. cerevisiae*, y hasta 10 ó 14 en arroz y álamo, respectivamente (Marini et al., 1997; Thomas et al., 2000; Suenaga et al., 2003; Couturier et al., 2007). El gran número de AMTs en algunos organismos es reflejo de lo finamente que está regulado el transporte de  $\text{NH}_4^+$  y de las diferentes capacidades y funciones de dichos transportadores.

La familia de transportadores de amonio (AMT/MEP) incluye además a las proteínas Rhesus (Rh) humanas, que se encuentran principalmente en eritrocitos, hígado y riñón, aunque también se han detectado en otros tejidos. De ahí que también se denomine esta familia de transportadores como AMT/MEP/Rh (TC 1.A.11). Análisis filogenéticos muestran que las proteínas Rh constituyen una discreta subfamilia (Liu et al., 2001; Ludewig et al., 2001), que no sólo está restringida a primates, ya que se han encontrado proteínas homologas (*Rh-like proteins*) en bacterias, algas, peces, insectos, mohos mucilaginosos y esponjas marinas, aunque no se han encontrado en plantas superiores. Algunas de estas proteínas Rh son capaces de transportar amonio, como RhAG en los eritrocitos humanos y NeRh-1 en la bacteria *Nitrosomonas europaea*, al tiempo que confieren resistencia al metilamonio (Marini et al., 2000a; Weidinger et al., 2007). Por otro lado, cabe

destacar que algunas de estas proteínas también son capaces de transportar CO<sub>2</sub> (Soupene et al., 2002; Musa-Aziz et al., 2009).

Los miembros de la familia AMT/MEP/Rh (TC 1.A.11) son proteínas integrales de membrana que tienen un masa molecular comprendida entre 50 y 55 kDa, con un tamaño que oscila entre 391 y 622 aminoácidos. La mayoría de los análisis *in silico* de estas proteínas indican que poseen 11 dominios transmembrana (DTM), con el extremo N-terminal orientado hacia el exterior y el C-terminal hacia el citosol. Por lo general, el extremo C-terminal presenta al menos 30 aminoácidos, altamente conservados, pero en algunos casos puede llegar a contener hasta 150 aminoácidos (von Wirén y Merrick, 2004). Diferentes estudios sugieren que, tanto en bacterias, como en plantas y hongos, las proteínas AMT forman trímeros, donde cada subunidad constituye un transportador funcional (Blakey et al., 2002; Ludewig et al., 2003; Marini et al., 2000b) y el extremo C-terminal de cada subunidad juega un papel importante en la regulación alostérica de la subunidad subyacente (Loqué et al., 2007).

Dado que el amonio existe como una mezcla de dos especies moleculares, NH<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, cuya proporción depende del pH, existe una gran controversia sobre la forma molecular que es transportada por las proteínas AMT/MEP/Rh. Diferentes estudios realizados con transportadores de amonio de plantas y proteínas Rh, sugieren varios mecanismos de acción para estas proteínas, que incluyen desde la difusión pasiva de NH<sub>3</sub>, el antiporte NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, el transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o el cotransporte NH<sub>3</sub>/H<sup>+</sup>.

### **2.1.2.1 AMTs en hongos**

En todos los genomas de hongos secuenciados hasta la fecha se han detectado transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Normalmente existen múltiples AMTs, como ocurre en *S. cerevisiae* (Marini et al., 1994, 1997), *Schizosaccharomyces pombe* (Mitsuzawa 2006) o *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle et al., 2001, 2003a), organismos en los que se han identificado y caracterizado tres AMTs. En función de la afinidad que presentan por el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se dividen en dos grupos: transportadores de alta afinidad (p. ej., *ScMep1*, *ScMep2*, *HcAMT1* y



*HcAMT2*) y de baja afinidad (p. ej., *ScMep3* y *HcAMT3*). Esta clasificación aparece reflejada en el análisis filogenético de los diferentes AMTs fúngicos, lo que sugiere que los transportadores agrupados dentro de un mismo grupo pueden compartir funciones comunes y desempeñar el mismo papel fisiológico (Javelle et al., 2003b; von Wirén y Merrick, 2004).

Además, a los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  fúngicos se les atribuye un papel sensor que controla su crecimiento y diferenciación. En *S. cerevisiae* la nutrición nitrogenada regula la formación de pseudohifas. Estas corresponden a un patrón de crecimiento de levaduras en estado diploide que les permite explorar el sustrato en busca de nutrientes cuando en el medio de crecimiento el  $\text{NH}_4^+$  se encuentra en baja concentración y la fuente de carbono fermentable es abundante (Gimeno et al., 1992). Además de su papel como transportador de alta afinidad de  $\text{NH}_4^+$ , a la proteína *Mep2* de *S. cerevisiae* se le atribuye la capacidad de actuar como el sensor que induce la formación de pseudohifas en respuesta a limitación de amonio (Lorenz y Heitman, 1998). Esta capacidad sensora parece estar restringida a algunos miembros del grupo de transportadores de alta afinidad. Así, algunos de ellos como *HcAMT1*, *HcAMT2* y *TbAMT1* son capaces de complementar la cepa diploide mutante de *S. cerevisiae* *mep2* $\Delta$  incapaz de formar pseudohifas (Montanini et al., 2002; Javelle et al., 2003a).

En algunos hongos, como *S. cerevisiae*, cuando hay disponibilidad de fuentes de N de fácil utilización existe un mecanismo diseñado para prevenir o reducir la innecesaria síntesis de transportadores y enzimas para la utilización de fuentes de N secundarias. Este mecanismo de regulación transcripcional, presente también en otros hongos, es denominado como represión catabólica por N (NRC, del inglés *Nitrogen Catabolic Repression*) (Magasanik y Kaiser, 2002). Así, la expresión de genes regulados por N en *S. cerevisiae* requiere de su activación por uno o dos factores de transcripción positivos del tipo GATA, *Gln3* (Mitchell y Magasanik, 1984) y *Nil1* (*Gat1*) (Stanbrough et al., 1995; Coffman et al., 1996). Diversos factores de transcripción GATA han sido también identificados y aislados en otros hongos: *Nit2* en *Neurospora crassa* (Fu y Marzlug, 1987), *AreA* en *Aspergillus*

*nidulans* (Kudla et al., 1990), Nut1 en *Magnaporthe grisea* (Froeliger y Carpenter, 1996) y Nre1 en *Tuber borchii* (Guescini et al., 2009).

### 2.1.2.2 AMTs en plantas

Los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  están ampliamente distribuidos en plantas, encontrándose tanto en mono- como en dicotiledóneas, y se expresan en la mayoría de los tejidos. Las plantas poseen múltiples AMTs, por ejemplo: 6 en el genoma de *A. thaliana*, 10 en el del arroz y 14 en el del álamo. La existencia de múltiples AMTs en plantas superiores permite una mayor flexibilidad en la regulación, así como una mayor especialización en orgánulos, células, tejidos y órganos, donde cada transportador puede desempeñar un papel fisiológico específico. Sus diferentes propiedades bioquímicas van a permitir a las células transportar amonio en un amplio rango de concentraciones (D'Apuzzo et al., 2004).

En plantas, la familia AMT se divide en dos subfamilias: AMT1 y AMT2 (Loqué y von Wirén, 2004). El análisis filogenético de estos genes indica que la subfamilia AMT1 incluye un único grupo de transportadores (grupo I) mientras que la subfamilia AMT2 engloba tres grupos diferentes (los grupos II, III y IV) (Suenaga et al., 2003). Los miembros de la subfamilia AMT1 son capaces de transportar metilamonio, mientras que los miembros de la subfamilia AMT2 no pueden o lo hacen con muy baja afinidad. Otra diferencia entre ambas subfamilias es que los miembros de la AMT1 no poseen intrones, a excepción de LjAMT1;1 (Salvemini et al., 2001), mientras que los miembros de la subfamilia AMT2 contienen algunos intrones en su secuencia. Por otro lado, los miembros de la subfamilia AMT2 están más relacionados filogenéticamente con los AMT de procariotas que con los AMT1 de plantas. Algunos miembros de la subfamilia AMT1 se expresan preferentemente en pelos radicales, por lo que se les atribuye fundamentalmente un papel en la absorción de  $\text{NH}_4^+$  a partir del suelo (Lauter et al., 1996; Ludewig et al., 2002). Varias características de la subfamilia AMT1, como su alta afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ , sugieren que podrían ser los responsables de la actividad del HATS en plantas. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que los niveles de transcripción de determinados

AMT1 se correlacionan con la actividad del HATS en raíces intactas (Gazzarrini et al., 1999; Kumar et al., 2003; Camañes et al., 2009), aunque dada la redundancia funcional existente dentro de la familia AMT esta correlación a menudo queda enmascarada. A diferencia de los miembros de la subfamilia AMT1, los miembros de la AMT2 no tienen un papel fisiológico tan bien definido. Por lo general, los AMT2 muestran un patrón de expresión más amplio y presentan unos niveles de expresión bajos (Suenaga et al., 2003; Couturier et al., 2007). Estas diferencias en el patrón de expresión apoyan el hecho de que algunos miembros de la subfamilia AMT2 puedan desempeñar otros papeles diferentes al de la absorción de  $\text{NH}_4^+$  en raíces, como pudiera ser la recuperación o reciclado de  $\text{NH}_4^+$  durante la fotorespiración o la senescencia, o la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  obtenido mediante la fijación biológica de  $\text{N}_2$  que transcurre en los nódulos (Howitt y Udvardi, 2000; von Wirén et al., 2000a; Simon-Rosin et al., 2003).

Algunos AMTs de la raíz muestran cambios de expresión durante el día (Gazzarrini et al., 1999), lo que parece estar relacionado con el aumento de la disponibilidad de sacarosa derivada de la fotosíntesis (Lejay et al., 2003). Por otro lado, mientras que algunos AMTs se expresan constitutivamente (Suenaga et al., 2003), otros modifican su patrón de expresión en función de la disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  (von Wirén et al., 2000b). En algunas especies como el arroz, que usan preferentemente  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N, algunos AMTs se inducen por  $\text{NH}_4^+$ , mientras que en otras especies su expresión se ve reprimida en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , incrementándose cuando hay menos  $\text{NH}_4^+$  disponible (Sonoda et al., 2003). También se ha observado que algunos AMTs se inhiben por glutamina (Rawat et al., 1999).

### 2.1.3 Asimilación de amonio

Las enzimas más importantes de la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  en hongos y plantas son la glutamina sintetasa (GS), la glutamato sintasa (también conocida como glutamina-oxoglutarato aminotransferasa o GOGAT), las cuales funcionan acopladas constituyendo el denominado ciclo GS/GOGAT, y la glutamato deshidrogenasa (GDH).

La GS cataliza la incorporación del  $\text{NH}_4^+$  al glutamato para formar glutamina, en una reacción dependiente de ATP. Seguidamente, la GOGAT cataliza la transferencia de un grupo amido desde la glutamina al  $\alpha$ -cetoglutarato, utilizando un equivalente de poder reductor para generar dos moléculas de glutamato, una de las cuales permite regenerar el ciclo. Por su lado la GDH cataliza la interconversión de glutamato en oxoglutarato en una reacción dependiente de NAD(P)H. La formación de glutamato, por una u otra vía, desempeña un papel estratégico en el metabolismo de todos los microorganismos pues conecta las reacciones catabólicas del metabolismo de carbono (producción de energía) con las reacciones anabólicas del metabolismo del N (producción de biomasa). Aproximadamente el 80% del nitrógeno celular se incorpora al grupo amino del glutamato, mientras que el 20% restante se incorpora al grupo amida de la glutamina, constituyendo los principales donadores de  $\text{NH}_4^+$  para multitud de transaminasas (Magasanik, 1996).

Diferentes estudios con precursores radiactivos, inhibidores enzimáticos y organismos mutantes, así como la determinación de las propiedades cinéticas de las diferentes enzimas aisladas, han permitido establecer un papel preponderante del ciclo GS/GOGAT en la asimilación de N en plantas. En cualquier caso, el papel de la GDH no puede ser totalmente excluido, asumiendo que tiene un papel predominantemente catabólico (Lea y Mifflin, 2003). En el caso de los hongos, la predominancia de una ruta u otra depende del organismo y de las condiciones de crecimiento en las que se encuentra (Meti et al., 2011).

En las raíces existen dos tipos de GS, la GS1 localizada en el citosol y la GS2 localizada en los plastos. El tipo mayoritario en la raíz es la GS1, y es la encargada de la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  transportado directamente desde el suelo o producido por la reducción de  $\text{NO}_3^-$  (Ireland y Lea, 1999). En plantas existen dos tipos diferentes de GOGAT en función de la especificidad por el donador de electrones, la Ferredoxina-dependiente (Fd-GOGAT) y la NADH-dependiente (NADH-GOGAT), generalmente localizadas en los plastos. En hojas, la Fd-GOGAT es el tipo mayoritario, alcanzando hasta el 95% de la actividad GOGAT de la hoja, y es la encargada de la asimilación

del  $\text{NH}_4^+$  durante la fotorrespiración. Por otro lado, la NADH-GOGAT se encuentra mayoritariamente en tejidos no fotosintéticos, como la raíz y los nódulos, donde se encarga de la asimilación primaria del N (Ireland y Lea, 1999). El papel que la GDH desempeña en plantas es incierto. Algunos autores le adjudican un papel catabólico, responsable de la degradación del glutamato en condiciones limitantes de C y N, mientras que otros sugieren que también puede desempeñar un papel en la biosíntesis de glutamato cuando el  $\text{NH}_4^+$  es abundante, atribuyéndole un papel en su detoxificación (Suárez et al., 2002; Lea y Mifflin, 2003).

En hongos superiores (ascomicetos y basidiomicetos) existen dos tipos de GDH en base a su especificidad por el donador de electrones, NAD-GDH y NADP-GDH. Cuando ambas están presentes, la NAD-GDH es la encargada de la degradación del glutamato, mientras que la NADP-GDH es la responsable de su biosíntesis.

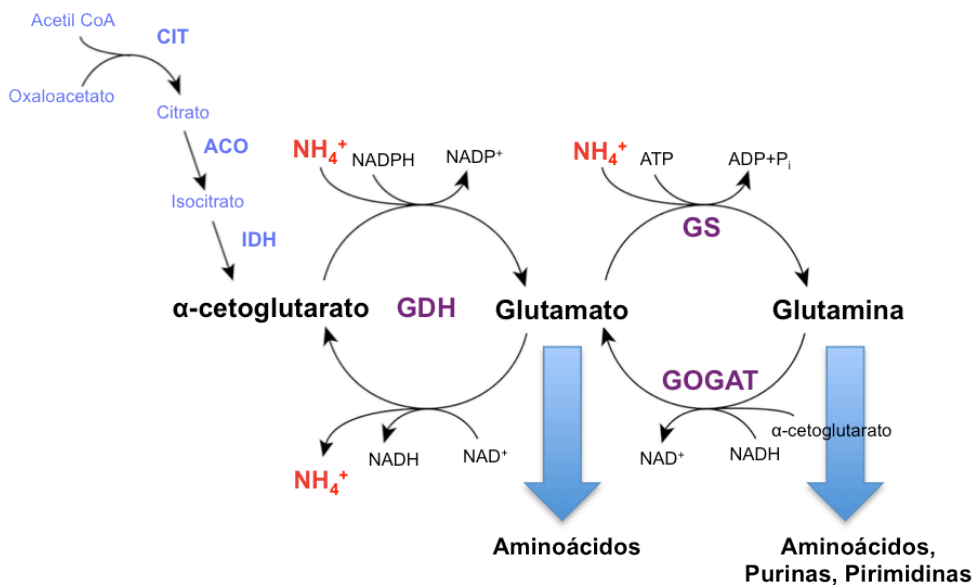


Figura 6. Rutas centrales del metabolismo del N.  
Adaptado de Magasanik y Kaiser (2002)

### 3. Absorción, transporte y metabolismo del N en micorrizas arbusculares

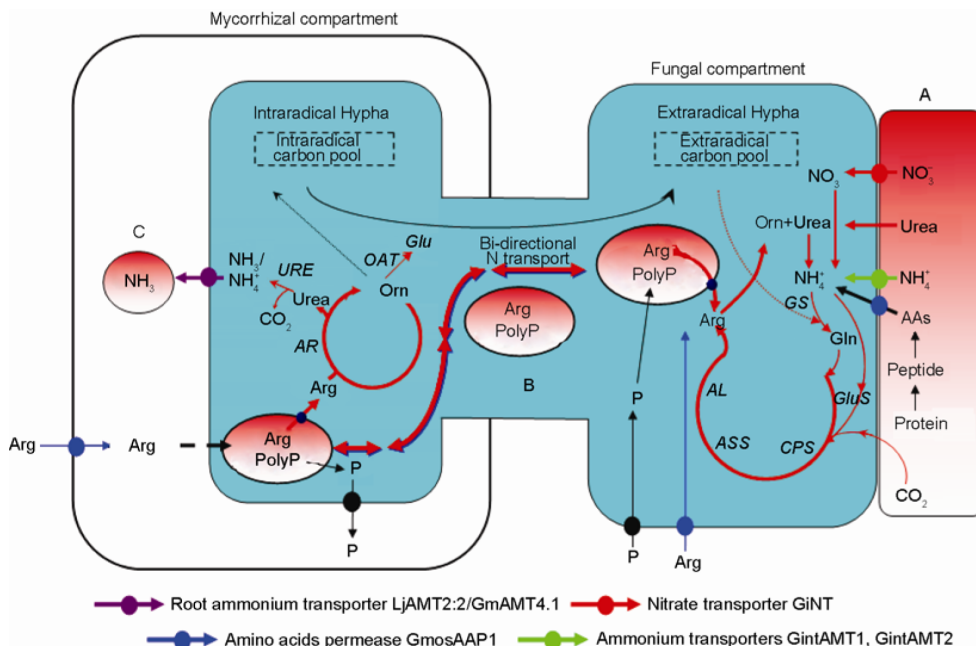
Al contrario de lo que ocurre con el P, pocos estudios consideran el papel de los hongos MA en la absorción de N. Aun así, existen evidencias de que los hongos micorrícicos son capaces de absorber cantidades significativas de N y transferirlo a la planta hospedadora (George et al., 1992; Johansen y Jensen, 1996). Utilizando diferentes sistemas *in vitro* se ha puesto de manifiesto que el micelio extrarradical es capaz de tomar N y transferir a la raíz entre un 20 y un 50% del N total absorbido (Toussaint et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005). Por otro lado, Tanaka y Yano (2005) estimaron que en plantas de maíz micorrizadas el 75% del N total de las hojas era absorbido y transferido por el micelio extrarradical de *Glomus aggregatum*. Se ha observado también que los hongos MA son capaces de transferir N de una planta a otra a través de la red de micelio que comparten (Bethlenfalvay et al., 1991; Cheng y Baumgartner, 2004; He et al., 2009). Se ha comprobado, igualmente, que pueden acelerar la descomposición de la materia orgánica del suelo, incrementando así la disponibilidad de N (Hodge et al., 2001; Leigh et al., 2009).

Los hongos MA son capaces de absorber y asimilar distintas formas de N como amonio (George et al., 1992; Johansen et al., 1992; Frey y Schüepp, 1993), nitrato (Tobar et al., 1994; Bago et al., 1996; Johansen et al., 1996) y aminoácidos (Hawkins et al., 2000; Hodge et al., 2001). Aunque son capaces de absorber y asimilar tanto  $\text{NH}_4^+$  como  $\text{NO}_3^-$ , existe una clara preferencia por el  $\text{NH}_4^+$  (Villegas et al., 1996; Toussaint et al., 2004), lo cual se podría explicar, al menos en parte, por la energía extra que el hongo necesita gastar para reducir el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  antes de incorporarlo en compuestos orgánicos (Raven et al., 1992).

El primer paso en la adquisición de N por la vía micorrícica requiere de la actividad de transportadores específicos localizados en la membrana plasmática del hongo, a nivel del micelio externo que se desarrolla en el suelo. Hasta la fecha se han identificado y caracterizado dos transportadores de amonio en *G. intraradices*, GintAMT1 (López-Pedrosa et al., 2006) y GintAMT2 (Pérez-Tienda et al., 2011, cuyo estudio y caracterización está

recogido en el Capítulo V de esta Memoria de Tesis Doctoral) y un transportador de aminoácidos en *G. mosseae* (GmosAAP1, Capellazzo et al., 2008). También se ha identificado un transportador de nitrato en *G. intraradices*, GintNRT1 (Tian et al., 2010). Por otro lado, en la reciente publicación del transcriptoma de *G. intraradices* (Tisserant et al., 2012) se han detectado dos nuevos transportadores: un tercer transportador de amonio (GintAMT3) y un segundo transportador de nitrato (GintNRT2). En la actualidad, ambos están siendo caracterizados por nuestro grupo de investigación.

La translocación del N desde el micelio extrarradical al intrarradical ocurre por procesos asociados al transporte de poliP y al ciclo de la urea, según el modelo propuesto por Bago y colaboradores en 2001 [Figura 7] y que está avalado por diferentes estudios de expresión génica, análisis bioquímicos y de marcaje isotópico (Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005; Cruz et al., 2007; Tian et al., 2010).



**Figura 7.** Modelo propuesto para la absorción, translocación y transferencia de N en hongos MA. Tomada de Jin et al. (2012).

El proceso comienza con la entrada del  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$  a través de los transportadores específicos ya mencionados. Posteriormente, el  $\text{NO}_3^-$  es transformado en  $\text{NH}_4^+$  por la nitrato reductasa (NR), actividad que se ha detectado en esporas (Ho y Trappe, 1975) y en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian y Charest, 1998). La publicación del transcriptoma de *G. intraradices* (Tisserant et al., 2012) ha revelado la existencia de varias secuencias que podrían codificar esta enzima. El  $\text{NH}_4^+$  absorbido o procedente de la reducción del  $\text{NO}_3^-$  sería posteriormente asimilado por el micelio extrarradical del hongo mediante el ciclo GS/GOGAT (Johansen et al., 1996; Breuning et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010), aunque el papel de la GDH no puede ser excluido.

Una vez incorporado en forma de aminoácidos, el N es translocado hacia el micelio intrarradical principalmente como Arg, el aminoácido mayoritario en el micelio externo (Johansen et al., 1996; Jin et al., 2005). La Arg se transloca en el interior de las vacuolas, asociada a cadenas de poliP, lo que contribuye a la neutralización de las cargas negativas de estos. Una vez en el arbusculo, se produce  $\text{NH}_4^+$  a partir de la Arg, mediante la acción del brazo catabólico del ciclo de la urea y se supone que es en esta forma en la que el hongo transfiere N a la planta (Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005). Este mecanismo requeriría que las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de aminoácidos se expresaran de forma diferencial en el micelio extrarradical e intrarradical del hongo. La evidencia parece confirmarlo. De hecho, estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real muestran que los genes del ciclo GS/GOGAT (GintGS1, GintGS2 y GintGOGAT) y los responsables de la síntesis de Arg (GintCPS, carbamil fosfato sintetasa; GintASS, argininosuccinato sintetasa; GintASL, argininosuccinato liasa) se expresan preferentemente en el micelio extrarradical, mientras que los genes involucrados en la hidrólisis de la Arg (GintARG, arginasa; GintURE, ureasa; GintOAT1 y GintOAT2, ornitina amino transferasa; GintODC, ornitina descarboxilasa) se expresan fuertemente en el micelio intrarradical (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010). Por otro lado, estudios bioquímicos sobre la actividad de diferentes enzimas, como la GS, ASS, ARG y URE, tanto en el micelio externo como en



raíces micorrizadas también avalan el papel de la Arg como molécula clave en la translocación de N en el micelio de los hongos MA (Cruz et al., 2007). La posibilidad de una transferencia directa de Arg, o de algún otro aminoácido, desde el hongo a la planta se ha descartado debido a que no se detecta carbono marcado en la parte aérea de la planta hospedadora cuando se añade  $^{13}\text{C}$ -acetato en el medio donde se desarrolla el hongo (Fitter et al., 1998).

No se conocen las proteínas transportadoras que mediarían el paso de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana plasmática del hongo hacia las interfaces simbióticas. Se ha propuesto que pueden estar involucradas proteínas similares a las Ato3 (del inglés, *ammonia transporter outwards*) de levaduras, que funcionan como antiportadores  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  localizados en la membrana plasmática. Alternativamente, o simultáneamente, otros mecanismos que podrían mediar el paso de  $\text{NH}_4^+$  hacia la matriz interfacial serían la difusión pasiva a favor de gradiente de  $\text{NH}_3$  o bien la fusión y descarga de vacuolas ricas en  $\text{NH}_4^+$  con la membrana plasmática del hongo en contacto con las interfaces simbióticas (Chalot et al., 2006; Ferrol y Pérez-Tienda, 2009).

Una vez en la matriz interfacial, la planta absorbe el  $\text{NH}_4^+$  liberado por el hongo a través de transportadores de amonio, específicos o no, localizados en la membrana plasmática. El paso del  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana vegetal también podría estar mediado por determinados canales, como las acuaporinas, y por transportadores dependientes de voltaje, como son los transportadores de  $\text{K}^+$  (Chalot et al., 2006; Ferrol y Pérez-Tienda, 2009). Recientemente, se han identificado transportadores de amonio específicos de la simbiosis que se expresan en células colonizadas por arbusculos en plantas de *L. japonicus* (Guether et al., 2009b), *M. truncatula* (Gomez et al., 2009) y soja (Kobae et al., 2010b) y que serían los responsables de la absorción del N que le llega a la planta por la vía micorrícica.

En la siguiente tabla [Tabla 1] se indican a modo de resumen todos los genes identificados hasta la fecha implicados en el transporte y metabolismo del N en el hongo MA *G. intraradices*.

**Tabla 1 · Genes implicados en el transporte y metabolismo de N en *G. intraradices***

<b>Función (nombre)</b>	<b>Nº Acceso</b>	<b>Ref.</b>
<b>Transporte de N</b>		
Ammonium transporter (GintAMT1)	CAI54276	e
Ammonium transporter (GintAMT2)	CAX32490	f
Ammonium transporter	remain_c10593 *	h
Nitrate transporter (GintNRT)	GU111919	g
Nitrate transporter	Glomus_c6942 *	h
Amino acid permease (GintAAP1)	AM940008	b
<b>Metabolismo de N</b>		
Nitrite reductase	Glomus_c4787 *	h
Glutamine synthetase	ABX71761	a
Glutamine synthetase 1 (GintGS1)	GU111909	g
Glutamine synthetase 2 (GintGS2)	GU111910	g
NADH-glutamate synthase (GintGOGAT)	GU111916	g
NAD-glutamate dehydrogenase (GDH)	Glomus_c4065 *	h
Asparagine synthase	Glomus_lrc1585 *	h
Carbamoyl-phosphate synthase (GintCPS)	GU111917	g
Argininosuccinate synthase (GintASS)	GU111911	g
Argininosuccinate lyase (GintASL)	GU111918	g
Arginase (GintARG)	GU111913	g
Ornithine aminotransferase 1 (GintOAT1)	GU111912	g
Ornithine aminotransferase 2 (GintOAT2)	TC109807 *	c
Ornithine decarboxylase (GintODC)	GU111914	g
Urease (GintURE)	GU111915	g
Urease accessory protein UreF	Glomus_c5443 *	h
Urease accessory protein UreG	CV186300	d

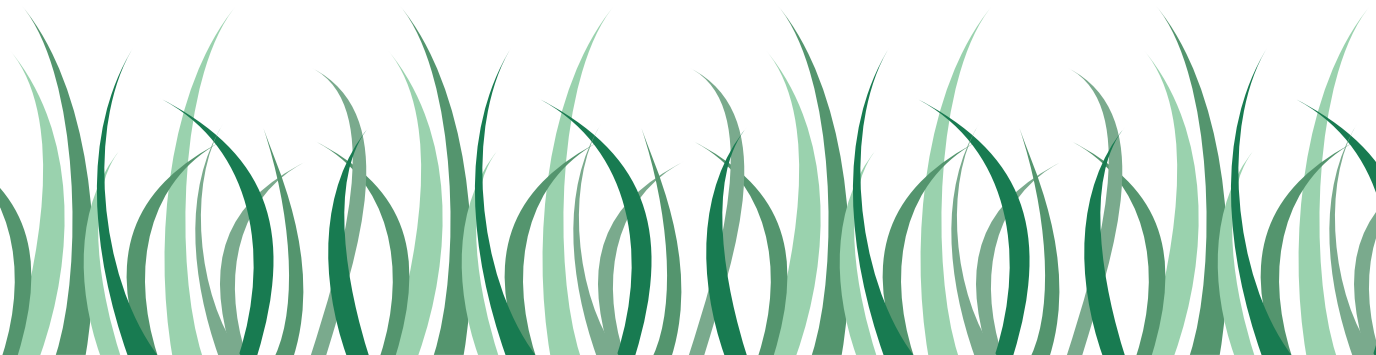
Número de acceso obtenido del GenBank, excepto los marcados con \* que se han obtenido de la base de datos del Genoma de *G. intraradices* (a, Breuninger et al., 2004; b, Cappellazzo et al., 2008; c, Gomez et al., 2009; d, Govindarajulu et al., 2005; e, López-Pedrosa et al., 2006; f, Pérez-Tienda et al., 2011; g, Tian et al., 2010; h, Tisserant et al., 2012)





Objetivos

III





## Objetivos

En la Introducción de la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha reflejado la importancia de los hongos MA en la nutrición mineral de las plantas y, en concreto, el papel que pueden desempeñar en la mejora de la nutrición nitrogenada. Se han revisado los conocimientos actuales sobre los procesos implicados en la absorción, asimilación y posterior transferencia del N desde el hongo a la planta. Sin embargo, y a pesar del potencial de los hongos MA como biofertilizantes, los mecanismos por los que tiene lugar la mejora de la nutrición nitrogenada de las plantas micorrizadas apenas empiezan a esclarecerse. Por esta razón, el objetivo general que se planteó en esta Tesis Doctoral fue el **estudio de los mecanismos implicados en el transporte y asimilación de N en MA.**

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar los sistemas de transporte de  $\text{NH}_4^+$  en el hongo MA *G. intraradices*.
2. Caracterizar las vías de asimilación de  $\text{NH}_4^+$  en *G. intraradices*.
3. Analizar la vía micorrícica de absorción y asimilación de N en plantas de arroz.





## Material y Métodos General

IV







## 1. MATERIALES BIOLÓGICOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

### 1.1 Micorrizas

#### 1.1.1. Hongo MA, *Glomus intraradices*

El hongo MA utilizado en el presente estudio es un aislado de *Glomus intraradices* Schenck & Smith, en concreto el aislado DAOM 197198 (Biosystematic Research Center, Ottawa, Canadá). Recientemente, este aislado ha sido renombrado por Krüger y colaboradores (2012) como *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. Por simplificar, puesto que esa nueva denominación no está completamente establecida, en esta Tesis Doctoral se continuará nombrando como *G. intraradices*.

##### 1.1.1.1. Cultivos monoxénicos

Dado el carácter de simbioses obligados de los hongos MA y con el fin de obtener material exclusivamente fúngico, libre de material vegetal o de otros microorganismos, se utilizó el sistema de cultivos monoxénicos, es decir, cultivos dobles del hongo MA con raíces cultivadas *in vitro*, en condiciones de completa esterilidad. El establecimiento de estos cultivos en placas de Petri bi-compartimentadas (St-Arnaud et al., 1996) permite la separación de las raíces micorrizadas (compartimento de la micorriza, CM) del micelio extrarradical (compartimento del hongo, CH). El material vegetal utilizado para el establecimiento de estos cultivo fue el clon DC2 de raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*.

Los cultivos se iniciaron colocando un segmento de raíz micorrizada en el CM, que contiene medio M (Tabla 2; Chabot et al., 1992). Las placas se incubaron en oscuridad a 24 °C hasta que el CH, que contiene medio M sin sacarosa (medio M-C), es colonizado por el hongo (aproximadamente 6 semanas). En este estadio, dependiendo del uso final del cultivo, el contenido del CH se mantiene tal cual o bien se reemplazó por medio ML (15 ml), un medio M-C modificado sin Phytigel™ (medio líquido) y en el que el resto de sus componentes se encuentran al doble de concentración.

---

**Tabla 2. Composición del medio M**

---

1.21 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
21.8 μM	NaFeEDTA
4.51 μM	KI
10%	Solución Macroelementos* <sup>1</sup> (v/v)
0.1%	Solución Microelementos* <sup>2</sup> (v/v)
1%	Solución Vitaminas* <sup>3</sup> (v/v)
1%	Sacarosa (p/v)
0.35%	Phytigel™ (p/v)
	(Sigma · Ref. P8169)

Ajustar pH 5.5 con NaOH

Autoclavar 20 minutos a 121°C

---

\*<sup>1</sup>**Solución Macroelementos:** 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 7.9 mM KNO<sub>3</sub>, 8.7 mM KCl, 0.35 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

\*<sup>2</sup>**Solución Microelementos:** 30 mM MnCl<sub>2</sub>, 9.3 mM ZnSO<sub>4</sub>, 24.2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

\*<sup>3</sup>**Solución Vitaminas:** 4 mM glicina, 29.6 μM hidrocloreuro de tiamina, 49 μM hidrocloreuro de piridoxina, 0.4 mM ácido nicotínico, 27.7 mM mio-inositol.

---

#### 1.1.1.1.1. Obtención de diferentes estructuras fúngicas

##### 1.1.1.1.1.1. Esporas

Las esporas se recuperaron del CH de cultivos monoxénicos desarrollados en medio M-C durante 3-4 meses siguiendo el método descrito

por Bago y colaboradores (1999). Brevemente, se retiró el CH de 3 placas con ayuda de un bisturí y se colocaron los medios gelificados, que contienen el micelio del hongo junto con las esporas, en el interior de un homogeneizador comercial (Waring, EEUU) junto con 200 ml de citrato sódico (10 mM, pH 6) para disolver el Phytigel™. Tras aplicar un pulso de 45 segundos a máxima potencia, las diferentes estructuras extrarradicales se recogieron con un tamiz de 50 µm. A continuación, las esporas se recuperaron con ayuda de un microscopio binocular y una pipeta. Finalmente, las esporas se lavaron con agua estéril e inmediatamente después se congelaron en N<sub>2</sub> y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

#### **1.1.1.1.1.2. Micelio extrarradical**

El contenido del CH de las placas de los cultivos monoxénicos desarrollados durante 6 semanas se retiró con la ayuda de un bisturí y se reemplazó por medio ML (15 ml). Las placas se volvieron a incubar en oscuridad a 24 °C durante aproximadamente 2 semanas, hasta que el hongo colonizaba nuevamente el CH y se encontraba en fase absorptiva. Durante este periodo las placas se examinaron periódicamente y se abrieron para retirar las raíces que intentaban pasar al CH.

En todos los experimentos en los que el micelio se destinaba para extraer ácidos nucleicos, éste era recogido con pinzas, lavado con agua estéril y secado en papel de filtro, para inmediatamente después congelarlo en N<sub>2</sub> y guardarlo a -80 °C hasta su uso.

#### **1.1.1.1.1.3. Raíces micorrizadas (micelio intrarradical)**

Para analizar la expresión génica en fase intrarradical, se colocaron raíces de zanahoria sin micorrizar sobre el medio M-C del CH densamente colonizado por el micelio externo del hongo (aproximadamente 6 semanas después del inicio de los cultivos). Ese micelio sirvió de inóculo para las raíces. Tras 15 días se retiraron las raíces y se eliminaron, con ayuda de unas pinzas y un microscopio binocular, todas las hifas extrarradicales adheridas a las raíces. A continuación se lavaron con agua estéril y se secaron con

papel de filtro, para inmediatamente después congelarlas en N<sub>2</sub> y guardarlas a -80 °C hasta su uso.

#### **1.1.1.1.2. Tratamientos del micelio extrarradical**

##### **1.1.1.1.2.1. Nitrógeno**

Una vez establecidos los cultivos y tras incubarlos en oscuridad a 24 °C durante aproximadamente 6 semanas, el medio M-C del CH, profusamente colonizado, se reemplazó por medio ML al cual se le había modificado la cantidad de N. Un grupo de cultivos se mantuvo con la concentración estándar de N (3.2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 100% N), mientras que en otro grupo la concentración de N se disminuyó hasta el 25% (0.8 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 25% N). Tras dos semanas aproximadamente, el medio del CH fue sustituido por medio ML fresco sin NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0% N). El momento en el que se cambió el medio sin N se consideró como tiempo 0 del tratamiento de ayuno de N, recogándose el micelio 2 y 7 días más tarde. Las pérdidas de Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup> resultantes de la reducción de las sales de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el medio ML modificado fueron compensadas con la adición de sales de Cl<sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, respectivamente.

Para los experimentos de aporte de N, se prepararon cultivos donde el micelio del CH se había desarrollado en medio ML con el 25% de N. Tras someter al micelio a 48 horas de ayuno de N, se suplementó el medio con diferentes fuentes nitrogenadas a diferentes dosis o agua (cultivos control). Como fuente de N inorgánico se utilizaron NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (3 mM o 30 μM en forma de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (3 mM o 30 μM en forma de KNO<sub>3</sub>). Como fuente de N orgánico se utilizó un hidrolizado de caseína (N-Z Amine HD; Sigma · Ref. C7210) al 2.5% (p/v), que proporcionaba una gran cantidad de aminoácidos libres. El micelio extrarradical se recogió 24 y 48 horas más tarde de aplicar el pulso.

##### **1.1.1.1.2.2. Carbono**

Una vez establecidos los cultivos y tras incubarlos en oscuridad a 24 °C durante aproximadamente 6 semanas, el medio M-C del CH, profusamente

colonizado, se reemplazó por medio ML y se dejó que el micelio creciera durante dos semanas. Tras este tiempo, el cultivo se suplementó con 4 mM de acetato sódico aportado al CH, o bien 25 mM de glucosa aportado al CM. El micelio extrarradical desarrollado en el CH de los cultivos de ambos tratamientos se recogió 2 y 7 días tras la adición de la fuente carbonada, con ayuda de unas pinzas. Posteriormente, se lavó, secó y congeló a -80 °C como se ha descrito previamente.

#### **1.1.1.2. Preparación de inóculo *in vivo***

El inóculo de *G. intraradices* se obtuvo mediante la inoculación de plantas de *Trifolium repens* L. y *Sorghum × drummondii* (Steud.) Millsp. & Chase con una mezcla de propágulos infectivos del hongo. Las plantas se hicieron crecer en una mezcla estéril de sepiolita:vermiculita (1:1, v:v), en condiciones controladas de invernadero, durante un mínimo de 9 meses. Tras determinar que el potencial micorrícico del inóculo era adecuado, la parte aérea de las plantas utilizadas para multiplicar el inóculo se cortó y eliminó, dejándose secar el resto del suelo con el sistema radical durante 2 semanas a temperatura ambiente. El sustrato, conteniendo esporas, micelio y fragmentos de raíz micorrizadas, se utilizó como inóculo micorrícico.

#### **1.1.2. Planta hospedadora, *Oryza sativa* L.**

La planta utilizada para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido el arroz (*Oryza sativa* L. cv. *Niponbare*). Las semillas de este cultivar fueron suministradas por el *International Rice Research Institute* (IRRI) de Filipinas.

##### **1.1.2.1 Esterilización y germinación de semillas**

Las semillas de arroz se esterilizaron en superficie antes de la siembra, según el protocolo siguiente:

- Inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto en agitación.
- Lavado con agua desionizada estéril y nuevo tratamiento con una solución de lejía comercial al 30% durante 30 minutos en agitación.

- Lavado durante 2-3 veces con agua desionizada estéril.
- Imbibición durante 10 minutos en agua desionizada estéril.

Las semillas se hicieron germinar en vermiculita estéril, a 28 °C, en una cámara de crecimiento en oscuridad hasta la aparición de la primera hoja, momento en el cual el semillero se cambió a la cámara de cultivo. Una vez que las plántulas alcanzaban unos 3 cm de altura fueron trasplantadas e inoculadas como se indica en el apartado 1.1.2.3.

##### **1.1.2.2 Sustrato de crecimiento**

El sustrato de crecimiento estaba compuesto por una mezcla de suelo:arena:vermiculita en proporción 1:2:6 (v:v:v). El suelo utilizado procedía de las estribaciones de Sierra Nevada (Granada) y presentaba las siguientes características fisicoquímicas: pH 6.7 (en agua); 10.84% materia orgánica; 5.6% C; 0.47% N; 0.03% P, 0.38% Ca; 0.42% K; 0.55% Mg. El suelo fue tamizado (2 mm) y esterilizado por tindalización en un autoclave a vapor fluente (100 °C durante 1 hora, 3 días consecutivos). De esta forma, el suelo queda libre de propágulos de micorrizas y otros organismos que puedan interferir en el experimento. La arena utilizada era de cuarzo (<2 mm), la cual se lavó previamente y esterilizó en autoclave (20 minutos a 121 °C). Del mismo modo, la vermiculita también fue esterilizada en autoclave.

##### **1.1.2.3 Inoculación con el hongo micorrízico**

Las plántulas de arroz se inocularon con *G. intraradices* mediante la adición de un 10% de inóculo (descrito en el apartado 1.1.1.2) al sustrato de crecimiento. Las plantas control recibieron 5 ml/maceta de un filtrado del inóculo fúngico que contenía las poblaciones microbianas acompañantes del mismo. Dicho filtrado se obtuvo tras macerar 10 g del inóculo en 100 ml de agua estéril durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras la maceración, el sobrenadante se filtró a través de una malla de 20 µm de luz para impedir el paso a los propágulos micorrízicos. Además, al sustrato de las plantas control se adicionó un 10 % de mezcla sepiolita:vermiculita (1:1),

similar a la base del inóculo micorrícico empleado, con el fin de equiparar el sustrato de las plantas controles al de las micorrizadas.

#### 1.1.2.4 Condiciones de crecimiento

Las plantas crecieron en condiciones controladas, en una cámara de cultivo con una humedad relativa del 60%, temperatura de 23/20 °C (día/noche) y un fotoperiodo de 14/10 horas. La intensidad lumínica fue de 280  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se dispusieron dos plántulas por maceta (300 ml) y se fertilizaron con solución nutritiva Hoagland 0.5x (Hoagland y Arnon, 1950), a la que se le aumentó la cantidad de hierro, ya que el arroz es muy dependiente de este elemento, y se le disminuyó la cantidad de fósforo, ya que cantidades elevadas de fósforo en el sustrato inhiben el desarrollo de la simbiosis micorrícica. La composición y preparación de la solución nutritiva modificada se muestra en la Tabla 3.

<b>Tabla 3. Composición de la solución de Hoagland 0.5x modificada</b>			
Compuestos	Concentración final	Solución madre (g/l)	Para 1 litro
<b>Macronutrientes</b>			
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.125 mM	13.61	1.25 ml
$\text{KNO}_3$	2.5 mM	50.55	5.00 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.5 mM	118.10	2.50 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1mM	49.29	5.00 ml
<b>Micronutrientes</b>			
$\text{H}_3\text{BO}_3$	23.1 $\mu\text{M}$	28.570	50 $\mu\text{l}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.55 $\mu\text{M}$	18.008	50 $\mu\text{l}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.38 $\mu\text{M}$	2.185	50 $\mu\text{l}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16 $\mu\text{M}$	0.798	50 $\mu\text{l}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 $\mu\text{M}$	0.247	50 $\mu\text{l}$
$\text{NaFeEDTA}$	90.0 $\mu\text{M}$	66.078	500 $\mu\text{l}$

#### 1.1.2.5 Tratamientos experimentales

Se aplicaron 4 tratamientos diferentes: plantas micorrizadas y plantas no micorrizadas, fertilizadas con dos regímenes de nitrógeno, 25% (1.875 mM) y 100% (7.5 mM). Las plantas se fertilizaron con la solución Hoagland 0.5x modificada (Tabla 3) dos veces por semana durante la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de cultivo, y 3 veces por semana desde la 4<sup>a</sup> semana hasta el final del



experimento. En el régimen del 25% de N, las pérdidas en  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$  resultantes de la reducción de las sales de  $\text{NO}_3^-$  fueron compensadas mediante la adición de las correspondientes sales de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , respectivamente. Se prepararon cinco repeticiones por tratamiento. Las macetas se distribuyeron al azar, rotándolas semanalmente para eliminar las posibles diferencias posicionales. Tras 8 semanas de crecimiento, se procedió a la cosecha de las plantas. Se determinó el peso húmedo de la parte aérea y de la raíz, se tomó una alícuota de la raíz de cada planta para la determinación de la colonización micorrícica, y el resto de las raíces y las hojas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **1.1.3. Sistema “sándwich”, *Medicago truncatula* - *G. intraradices***

El material biológico utilizado para la microdissección láser fue obtenido a partir de raíces de plantas de *M. truncatula* inoculadas con esporas de *G. intraradices* desarrolladas en esterilidad. Se utilizó un sistema de cultivo *in vitro* denominado “sándwich”, tal y como se describe en Guether y colaboradores (2009a).

### **1.1.4. Tinción de raíces y cuantificación de la colonización micorrícica**

Para cuantificar la colonización micorrícica de la raíz se utilizó el método de intersección de Giovannetti y Mosse (1980), con algunas modificaciones que se indican a continuación. Las raíces se tiñeron con azul tripán (Phillips y Hayman, 1970). Este colorante tiene afinidad por la quitina, principal componente de la pared celular de los hongos MA (Bartnicki-García, 1968). El procedimiento seguido es el siguiente:

- Los fragmentos de raíz de cada alícuota se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm y se sumergieron en una solución de KOH al 10% (p/v) durante 30 minutos a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  (“baño María”) para clarificar la raíz.
- Transcurrido este tiempo se eliminó el KOH y los segmentos de raíz se lavaron con agua varias veces.

- Las raíces se sumergieron en una solución de HCl 0.1 M durante 5 minutos a temperatura ambiente para acidificar el medio.
- Posteriormente, se retiró la solución de HCl y las raíces se sumergieron en una solución de azul tripán al 0.05% en ácido láctico durante 30 minutos a 90 °C (“baño María”).
- Por último, se eliminó el exceso de colorante y las raíces se conservaron en ácido láctico hasta su posterior cuantificación.

Para la cuantificación de la colonización micorrícica, los segmentos de raíz teñidos se extendieron de forma aleatoria sobre una placa de metacrilato cuadrículada (1x1 cm). A continuación se contabilizaron las intersecciones entre las líneas horizontales y verticales de la cuadrícula con los segmentos de raíz, discriminando entre micorrizados y no micorrizados. La colonización micorrícica se obtiene de la relación entre las intersecciones donde la raíz presenta colonización y el número total de intersecciones cuadrícula-raíz.

#### 1.1.5. Índice MGR

Para cuantificar las respuestas de la plantas asociadas a la micorrización se calculó el índice MGR (del inglés, *Mycorrhizal Growth Response*) de acuerdo con la fórmula de Hetrick y colaboradores (1992):

$$\text{MGR} = 100 \cdot (\text{M}-\text{NM})/\text{NM}$$

donde M y NM se refiere a la biomasa (peso seco) de las plantas micorrizadas (M) y plantas no micorrizadas (NM).

#### 1.1.6. Análisis de nutrientes en hojas de arroz (*Oryza sativa* L.)

El análisis de nutrientes de las diferentes muestras vegetales se realizó en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, CSIC). La determinación del contenido de C y N se realizó mediante un analizador elemental de Leco® Corporation (TruSpec® CN, Michigan, USA), mientras que la determinación de P se realizó mediante

espectrometría de emisión óptica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, del inglés *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) usando el equipo iCAP 6500 ICP Spectrometer de Thermo Scientific.

Para las determinaciones, las muestras vegetales se pulverizaron usando un mortero y nitrógeno líquido. El polvo resultante se dejó secar a 65 °C durante al menos 48 horas. Previo al análisis mediante ICP-MS fue necesario realizar una digestión ácida de las muestras mediante HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando para ello una ultraclave-microondas, en concreto la Milestone Ethos ONE.

## 1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa mutante de *S. cerevisiae* 31019b (MATa *ura3 mep1Δ mep2Δ::LEU2 mep3Δ::KanMX2*; Marini et al., 1997), deficiente en el transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e incapaz de crecer cuando la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio es inferior a 5 mM. Esta cepa se utilizó para llevar a cabo la caracterización funcional del transportador de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de *Glomus intraradices*, GintAMT2. Esta cepa se cultivó en oscuridad a 30 °C.

### 1.2.1 Medios de cultivo

#### 1.2.1.1 Medio YPD

El medio YPD (del inglés, *Yeast extract-Peptone-Dextrose medium*) es un medio rico de crecimiento no selectivo para levaduras.

---

1%	Extracto de levadura
2%	Peptona
2%	Dextrosa (D-Glucosa)
2%	Agar (opcional)

Autoclavar 20 minutos a 121 °C

---

Procedimiento:

- Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 950 ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Añadir 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.
- Añadir 50 ml de una solución de glucosa 40%, previamente esterilizada en autoclave.
- Almacenar a 4 °C.

### 1.2.1.2 Medio SD

El medio SD (del inglés, *Synthetic-Dextrose medium*) es un medio mínimo definido usado para el crecimiento selectivo de levaduras en base a la auxotrofia que presente la cepa a cultivar. Se utiliza normalmente para mantener de forma selectiva una cepa transformada con un plásmido.

---

0.67%	Base nitrogenada sin aminoácidos (Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids · Ref. 291940)
2%	Dextrosa (D-Glucosa)
0.01%	Adenina, arginina, cisteína, leucina, lisina, treonina, triptófano y/o uracilo, si son necesarios.
0.005%	Aspartato, histidina, isoleucina, metionina, tirosina, prolina, fenilalanina, serina y/o valina, si son necesarios.
2%	Agar (opcional)

---

Procedimiento:

- Preparar soluciones madre de cada uno de los componentes (10x para la base nitrogenada y glucosa, y 100x para cada aminoácido) y esterilizar por filtración. Mantener las soluciones a 4 °C protegidas de la luz.
- Mezclar el volumen correspondiente de las diferentes soluciones madre y completar con H<sub>2</sub>O desionizada estéril hasta el volumen deseado, justo antes de ser utilizado.
- En el caso de las placas, para un litro de medio autoclavar 20 g de agar en 750 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, dejar que la solución se enfríe hasta ~55 °C y añadir entonces 100 ml de las soluciones madre de la base

nitrogenada y de glucosa, previamente atemperadas, y 10 ml de los aminoácidos requeridos. Completar hasta un litro con H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Esperar a que el medio solidifique y mantener las placas a 4 °C invertidas y protegidas de la luz.

##### 1.2.1.3 Medio YNB-N

El medio YNB-N (medio mínimo sin nitrógeno) es un medio definido, sin ninguna fuente de N, que permite ajustar la fuente de N en función de las necesidades del experimento. Su composición es la misma que la del medio SD (apartado 1.2.1.2), pero en el que la base nitrogenada se ha sustituido por otra que no contiene aminoácidos ni sulfato amónico (Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate, Ref. 233520).

##### 1.2.2 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la metodología descrita por Gietz y Schiestl (2007), siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

- Poner un precultivo de la cepa a transformar en 5 ml de medio rico (YPD) e incubar en agitación a 30 °C durante toda la noche.
- Inocular 50 ml de YPD (en un matraz de 250 ml) con el precultivo a una DO<sub>600</sub> de 0.4-0.5. Incubar a 30 °C hasta que la DO<sub>600</sub> del cultivo sea próxima a 1 (2-3 h).
- Centrifugar 10 ml del cultivo a 3 000 g durante 5 minutos.
- Mientras se centrifugan las células desnaturalizar el ADN de espermatozoos de salmón (Sigma, Ref. D-1626)\*<sup>1</sup>.
- Resuspender las células en 8 ml de agua desionizada estéril. Centrifugar de nuevo y retirar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento en 1 ml de solución de litio\*<sup>2</sup> y transferir a un eppendorf de 1.5 ml.
- Sedimentar las células por centrifugación a 3 000 g durante 5 minutos.
- Resuspender las células en 100 µl de la solución de litio.

- Centrifugar 50  $\mu$ l de las células durante 1 minuto a 20 000 g, retirar el sobrenadante y mantener el sedimento de células en hielo hasta que se vaya a realizar la transformación.
- Añadir a las células sedimentadas los siguientes reactivos en el orden que se indica:

---

300 $\mu$ l	Solución PEG <sup>*3</sup>
6 $\mu$ l	Solución de litio
25 $\mu$ l	ADN de esperma de salmón
X $\mu$ l	1 $\mu$ g plásmido

Completar hasta 360  $\mu$ l con agua milliQ  
Mezclar mediante pipeteo.

---

- Incubar durante 30 minutos en agitación a 30 °C
- Incubar en un baño a 42 °C durante 20 minutos.
- Sedimentar las células mediante centrifugación a 6 000 g durante 30 segundos.
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua estéril mediante pipeteo.
- Sembrar 10, 50 y 100  $\mu$ l en medio selectivo e incubar las placas a 30 °C durante 2-3 días.

---

<sup>\*1</sup>**ADN de esperma de salmón:** Preparar una dilución 1:4 (v:v) de la solución madre (10 mg/ml) en tampón TE pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8), hervirlo durante 5-7 minutos y mantener en agua-hielo hasta su uso.

<sup>\*2</sup> **Solución de litio (100 mM):** 100 mM acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.

<sup>\*3</sup> **Solución PEG:** 40% PEG<sub>3350</sub>, 100 mM acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.

---

### 1.2.3 Mantenimiento de las cepas

Las diferentes cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta Tesis Doctoral se conservaron en glicerol al 20% a -80 °C. Para ello, las diferentes cepas se

cultivaron a 30 °C en medio líquido selectivo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial. Finalmente, se añadieron a un criotubo estéril 750 µl de estos cultivos y 250 µl de una solución de glicerol al 80% estéril. Se mezclaron bien y se almacenaron a -80 °C.

### 1.3 Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa TOP10F' [F'*{lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)}* *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*] de *E. coli* (Invitrogen, Ref. C303003) para la amplificación y multiplicación de los plásmidos. Esta cepa permite la selección de clones recombinantes mediante detección de la actividad β-galactosidasa tras la inducción del gen LacZ del vector de clonación con IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Esta cepa se cultivó en oscuridad a 37 °C.

#### 1.3.1. Medios de cultivo

##### 1.3.1.1. Medio LB (Lysogeny broth)

Es un medio rico de crecimiento utilizado habitualmente para el cultivo de *E. coli*.

---

1.0%	Triptona
0.5%	Extracto de levadura
1.0%	NaCl
1.5%	Agar (opcional)

Ajustar a pH 7.0 con NaOH

---

Procedimiento:

- Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

- Ajustar el pH de la solución a 7.0 con NaOH y completar el volumen hasta un litro.
- Opcional: añadir 15 g/l de agar (1.5%) si se desea preparar medios sólidos.
- Esterilizar en autoclave. Dejar que la solución se enfríe hasta ~55 °C y añadir marcadores de selección\* si son necesarios.
- Almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C.

---

\* Los marcadores de selección más utilizados son los genes de resistencia a antibióticos, como ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. Como regla general, las bacterias transformadas se cultivan siempre en presencia del antibiótico para evitar que pierda el plásmido que se le ha introducido.

**Solución de Ampicilina 1000x:** 100 mg/ml ampicilina en agua desionizada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C.

---

### 1.3.1.2. Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)

Se utiliza para aumentar la eficiencia de transformación de *E. coli*.

---

1.0%	Triptona
0.5%	Extracto de Levadura
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glucosa (Dextrosa)

Ajustar a pH 7.0~7.5 con NaOH

---

Procedimiento:

- Disolver 20 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.



- Añadir 10 ml de una solución 1 M de NaCl, 2.5 ml de una solución 1 M de KCl, 10 ml de una solución 1 M de MgCl<sub>2</sub> y 10 ml de una solución 1 M de MgSO<sub>4</sub>.
- Ajustar el pH de la solución a 7.0~7.5 con NaOH y completar el volumen hasta 980 ml.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
- Almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C.
- Añadir 20 ml de una solución de glucosa 1 M estéril antes de usar.

### 1.3.2. Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

La preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* se realizó según la técnica descrita por Hanahan (1983). Todo el material usado (puntas de pipeta, tubos de centrífuga, eppendorf, etc.) debe estar estéril y muy frío. El procedimiento es el siguiente:

- Dejar crecer toda la noche un preinóculo de *E. coli* en medio LB suplementado con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y el marcador de selección.
  - Inocular 2 ml del preinóculo en 50 ml de medio LB suplementado con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y el marcador de selección.
  - Incubar a 37 °C hasta que el cultivo alcance una DO<sub>550</sub> de 0.5 (1-2 horas).
  - Transferir el cultivo a tubos de centrífuga SS-34 y enfriar en hielo 15 minutos.
  - Centrifugar los tubos a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
  - Retirar el sobrenadante suavemente y secar bien las paredes del tubo.
  - Resuspender las células en 16 ml de solución RFI<sup>1</sup> y mantener durante 15 minutos en hielo.
  - Centrifugar a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
  - Retirar el sobrenadante y resuspender las células en 2 ml de RFII<sup>2</sup> e incubar 15 minutos en hielo.
  - Hacer alícuotas de 100 µl.
  - Congelar en N<sub>2</sub> líquido y almacenar a -80 °C.
-

**\*1Solución RFI:** 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM acetato potásico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 11.9% glicerol. Ajustar a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M. Esterilizar por filtración.

**\*2Solución RFII:** 10 mM MOPS, 1 mM RbCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 11.9% glicerol. Ajustar a pH 6.8 con NaOH 0.5 M. Esterilizar por filtración.

---

### **1.3.3. Transformación de células quimiocompetentes de *E. coli***

Se utilizó la metodología descrita por Rodríguez y Tait (1983) siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

- Mantener una alícuota de 100 µl de células competentes en hielo.
- Añadir 25 ng de ADN plasmídico, agitar suavemente e incubar en hielo durante 30 minutos.
- Incubar durante 90 segundos a 42 °C.
- Enfriar en hielo 5 minutos.
- Añadir 1 ml de LB e incubar 1 hora 30 minutos en agitación a 37 °C.
- Sembrar las células en placas de medio selectivo que contiene el antibiótico de selección según el vector utilizado e incubar las placas toda la noche a 37 °C.

### **1.3.4. Mantenimiento de las cepas**

Las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis Doctoral se conservaron en glicerol al 20% a -80 °C. Para ello las diferentes cepas se cultivaron a 37 °C en medio líquido selectivo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial. Finalmente, se añadieron a un criotubo estéril 750 µl de estos cultivos y 250 µl de una solución de glicerol al 80% estéril. Se mezclaron bien y se almacenaron a -80 °C.

## 2. DETERMINACIONES CINÉTICAS

### 2.1 Medida y determinación de los parámetros cinéticos del influjo del ión $^{15}\text{NH}_4^+$ en el micelio extrarradical de *G. intraradices*

Para medir el influjo del ión  $^{15}\text{NH}_4^+$  en el micelio extrarradical de *G. intraradices*, se utilizaron 6 placas de cultivo monoxénico en medio líquido para cada tratamiento. El procedimiento, adaptado de Gazzarrini y colaboradores (1999), es el siguiente:

- Reemplazar el medio ML del CH por nuevo medio ML y mantener durante 24 horas a 24 °C (pretratamiento).
- Retirar el medio ML y añadir 15 ml de una solución de  $\text{CaSO}_4$  0.1 mM para lavar el micelio del exceso de sales del medio de cultivo. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Reemplazar la solución de  $\text{CaSO}_4$  por 15 ml de la solución de influjo\*<sup>1</sup> suplementada con diferentes concentraciones de  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (99% átomos  $^{15}\text{N}$  en exceso). Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar la solución de influjo y añadir 15 ml de una solución fría de  $\text{CaSO}_4$  0.1 mM para lavar el micelio del exceso de  $^{15}\text{N}$  de la solución de influjo. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Recoger el micelio de cada tratamiento y separar en 2-4 alícuotas. Colocar cada alícuota en una cápsula de estaño y secar en una estufa a 65 °C durante 48 horas.

---

\***Solución de influjo:** Está compuesta por medio ML sin nitrógeno (apartado 1.1.1.1.2.1).

---

#### 2.1.1 Determinación del influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$

El contenido en  $^{15}\text{N}$  del micelio se determinó mediante espectrometría de masas (Clarkson et al., 1996), utilizando un espectrómetro de masas de flujo continuo, acoplado a un autoanalizador elemental C/N (Euro-EA Analizador

Elemental, EuroVector S.P.A., Italia; e Isoprime Espectrómetro de masas, GV Instruments, Reino Unido).

Los valores del influjo del ión  $^{15}\text{NH}_4^+$  se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de  $^{15}\text{NH}_4^+$  (g peso seco de micelio (PS)) $^{-1}\text{h}^{-1}$ . Para calcular estos valores se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{Influjo } ^{15}\text{N} = \text{A} \times \text{B} \times 144.3$$

donde: A = % de N elemental (dato obtenido del autoanalizador); B = % de  $^{15}\text{N}$ , dato que se obtiene tras restar al % de  $^{15}\text{N}$  obtenido por el autoanalizador la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  (%  $^{15}\text{N} - 0.3642166$ ) y 144.3, es el factor de conversión para obtener  $\mu\text{mol}$  (g PS) $^{-1}\text{h}^{-1}$ .

### 2.1.2 Determinación de los parámetros cinéticos de influjo de $^{15}\text{NH}_4^+$

Para determinar los parámetros cinéticos de la absorción del ión  $^{15}\text{NH}_4^+$  (influjo) se determinó el contenido en  $^{15}\text{N}$  del micelio extrarradical expuesto a diferentes concentraciones externas de amonio  $^{15}\text{NH}_4^+$  en la solución de influjo (2, 5, 10, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , y 1, 5, 12.5 y 25 mM). Se obtuvieron los diagramas de Eadie-Hofstee representando el influjo de  $\text{NH}_4^+$  (v) *versus* el cociente entre el influjo de  $\text{NH}_4^+$  y la concentración de  $^{15}\text{NH}_4^+$  (v/S). Tras analizar los resultados se determinaron las constantes cinéticas de Michaelis-Menten ( $K_m$  y  $V_{\text{max}}$ ) a partir del análisis de regresión de la representación gráfica de los dobles inversos de los influjos *versus* las  $^{15}\text{NH}_4^+$  comprendidas en un intervalo de 0-100  $\mu\text{M}$ , ya que a concentraciones superiores el influjo de  $^{15}\text{NH}_4^+$  no es saturable (transformación de Lineweaver-Burk).

### 2.1.3 Tratamientos experimentales

Basándonos en los resultados del estudio cinético (ver capítulo V apartado 3.1), el influjo para las HATS se satura a una  $^{15}\text{NH}_4^+$  comprendida entre 2  $\mu\text{M}$  y 1 mM, por lo que el influjo medido a una  $^{15}\text{NH}_4^+$  de 10  $\mu\text{M}$  fue seleccionado como concentración representativa del

sistema HAT en los siguientes estudios. Para el influjo de  $^{15}\text{NH}_4^+$  mediado por el sistema LAT se seleccionó 2 mM de  $^{15}\text{NH}_4^+$  como concentración representativa en los siguientes estudios.

### **2.1.3.1 Efecto del pH**

Con el fin de determinar el efecto del pH en el influjo del ion  $^{15}\text{NH}_4^+$  se ajustó el pH del medio ML utilizado en el tratamiento de 24 horas previo a la medida del influjo y de la solución del influjo a valores de 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 con tampón 10 mM MES-Tris.

### **2.1.3.2 Efecto de inhibidores metabólicos**

Con el fin de ver la dependencia energética del transporte, el medio ML utilizado en el pretratamiento se suplementó, o no, 30 minutos antes de realizar la medida del influjo con distintos inhibidores disueltos en etanol absoluto (2 ml/l) para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  de CCCP (carbonycyanide m-clorophenyl-hydrazone) o 50  $\mu\text{M}$  de 2,4-DNP (2,4-dinitrophenol). El medio ML de las placas control fue suplementado con etanol absoluto a la misma concentración final.

### **2.1.3.3 Efecto del aporte de carbono**

Con el fin de determinar el efecto de la adición de una fuente de carbono en el influjo del ion  $^{15}\text{NH}_4^+$ , tras el tratamiento de 24 h previo a la medida del influjo, a un grupo de cultivos se les sustituyó el medio ML del pretratamiento por 15 ml de medio ML suplementado con 4 mM de acetato. Tras 24 h de incubación con la fuente de carbono se procedió a medir el influjo mediado por el sistema HAT y por el sistema LAT.

## **2.2 Medida del influjo de $^{14}\text{C}$ metilamina hidrocloclorhídrica en levadura**

Dado que el transporte de  $\text{NH}_4^+$  no se puede medir directamente, se utilizó un análogo estructural marcado radiactivamente, la  $^{14}\text{C}$ metilamina

hidroclorhídrica (MA\*, 57 mCi/mmol; Ge Healthcare, Ref. CFA157). El protocolo seguido es el siguiente:

- Preparar un preinóculo de 10 ml en medio YNB-N suplementado con 0.1% prolina y tamponado con 50 mM MES-Tris pH 6.1. Incubar durante 24 horas a 30 °C en agitación.
  - Inocular 150 ml de medio YNB-N suplementado con prolina (0.05%) y tamponado con 50 mM MES-Tris pH 6.1 (en un matraz de 500 ml) con el preinóculo, de modo que la DO<sub>600</sub> sea de 0.2. Incubar en un agitador orbital a 30 °C hasta que el cultivo alcance un DO<sub>600</sub> ~ 0.5-0.7 (aproximadamente 7-8 h).
  - Recoger las células por centrifugación a 2 500 g a 10 °C durante 8 minutos y lavar el sedimento dos veces con PB\*<sup>1</sup> 1x.
  - Resuspender las células en PB 1x, dejar crecer hasta que el cultivo alcance una DO<sub>600</sub> ~ 8 y hacer alícuotas de 95 µl (tantas como concentraciones de MA\* se vayan a determinar por el número de repeticiones de cada una de ellas).
  - Añadir 5 µl de glucosa al 40% e incubar 5 minutos a 30 °C.
  - A continuación añadir 100 µl de la correspondiente solución de MA\* en SPB 1x a las células.
  - Retirar alícuotas de 45 µl a diferentes tiempos (20, 40, 60 y 120 segundos para concentraciones de MA\* de 3, 6 y 9 µM; y 30, 60, 120 y 240 segundos para las concentraciones de 12, 25, 50, 100, 500, 1000 y 2000 µM) y añadir las a tubos que contienen 4 ml de solución de parada\*<sup>2</sup> fría.
  - Filtrar inmediatamente en un filtro de fibra de vidrio CF/G de 0.45 µm (Whatman, Ref. 1822 025) usando un sistema múltiple de filtración a vacío de Millipore (1225 Sampling Manifold, Ref. XX2702550). Lavar dos veces el filtro con agua desionizada. Dejar secar el filtro a temperatura ambiente, pasarlo a un vial de centelleo y añadir 4 ml de líquido de centelleo.
  - Determinar la radiactividad incorporada en las células en un contador de centelleo líquido.
-

<sup>\*1</sup> **Tampón PB 5x (0.1 M, pH 7):** Para un volumen total de 600 ml, mezclar 117 ml de 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 183 ml de 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y completar con agua desionizada. Esterilizar en autoclave.

<sup>\*2</sup> **Solución de parada:** 100 mM Metilamina hidroclorehídrica en PB 1x. Esterilizar en autoclave y guardar a 4 °C.

---

### 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.1 Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

##### 3.1.1 Extracción de ADN genómico de *G. intraradices*

El ADN genómico de *G. intraradices* se extrajo a partir de unos 30 mg de micelio externo procedente de un cultivo monoxénico utilizando el kit comercial “DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Ref. 69104)”, siguiendo las instrucciones de fabricante.

##### 3.1.2 Extracción de ADN genómico de *O. sativa*

Para extraer el ADN genómico de arroz se partió de 2 g de hojas previamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido y almacenadas a -80 °C, siguiendo el protocolo adaptado de Murray y Thompson (1980) que se detalla a continuación:

- Triturar vigorosamente el tejido con N<sub>2</sub> líquido en un mortero de porcelana previamente enfriado.
- Añadir 15 ml del tampón de extracción CTAB<sup>\*1</sup>, homogeneizar hasta que se descongele y transferir el homogenado a un tubo estéril.
- Añadir 2.5 ml de sarkosil al 5% y mezclar por inversión del tubo.
- Incubar durante 1 hora a 60 °C, mezclando ocasionalmente por inversión.
- Añadir 10 ml de una mezcla cloroformo:isoamílico (24:1, v:v). Mezclar por inversión del tubo unas 20-30 veces hasta que se forme una emulsión.

- Centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos en un rotor SS34.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo y añadir cuidadosamente hasta un total de 11.5 ml de isopropanol frío, mezclando de vez en cuando por inversión.
- Centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Añadir 5 ml de NH<sub>4</sub>AcO (10 mM) disuelto en etanol al 76% e incubar a 4 °C durante toda la noche.
- Centrifugar 15 minutos a 4 000 rpm. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y secar el precipitado a vacío.
- Resuspender el ADN en 200 µl de tampón TE<sup>\*2</sup> pH 8 o en H<sub>2</sub>O milliQ.
- Para solubilizar el ADN se incubó durante 30 minutos a 65 °C.
- Cuantificar y almacenar a -20 °C.

---

**\*1Tampón de extracción CTAB:** 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 0.7 M NaCl, 1% CTAB (Cetil Trimethyl Ammonium Bromide), 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone), 1% β-mercaptoetanol. Preparar la solución sin PVP ni β-mercaptoetanol. En el momento de usar, calentar a 65 °C para disolver el CTAB. A continuación añadir 2% PVP (p/v) y 1% β-mercaptoetanol (v/v).

**\*2Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.

---

### 3.1.3 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit comercial “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Ref. PLN70)” de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.1.4 Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Para la extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae* se utilizó el kit comercial “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Ref. PLN70)” aplicando una serie de modificaciones al protocolo comercial que se recogen y detallan a continuación:



- Centrifugar a 5.000 g durante 5 minutos 5 ml de un cultivo crecido durante 16 horas a 30 °C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender las células mediante pipeteo o vortex en 200 µl de la solución de resuspensión del kit.
- Añadir 100 µl de cuentas de cristal (*glass beads*, Sigma, Ref. G-8772) y agitar mediante el vortex durante 5 minutos.
- Dejar decantar y transferir con cuidado el sobrenadante a un tubo nuevo.
- A partir de aquí se sigue el protocolo indicado por el fabricante añadiendo 200 µl de la solución de lisis.

El rendimiento de esta extracción es bajo, por lo que generalmente es necesario transformar con 25-50 ng del plásmido obtenido células quimiocompetentes de *E. coli* (apartado 1.3.3) y extraer el plásmido de nuevo (apartado 3.1.3).

### 3.1.5 Extracción rápida de ADN total a partir de colonia

Con esta técnica se obtiene ADN a partir de colonias, tanto de bacterias como de levaduras, de una calidad suficiente como para su amplificación por PCR, lo que permite realizar, de forma rápida, escrutinios de colonias transformadas. Los lisados de las colonias se prepararon de distinta forma, dependiendo de si se trataba de bacterias o levaduras.

- **Bacterias:** Una colonia, o parte de ella, se transfirió usando un palillo o punta de pipeta estéril a un tubo de PCR de 0.2 ml conteniendo 10 µl de agua desionizada estéril. La lisis se produce por calentamiento durante la primera incubación, a 95 °C, de la PCR.
- **Levaduras:** Se transfirió parte de una colonia sobre la pared de un tubo de PCR de 0.2 ml con ayuda de un palillo o punta de pipeta estéril. A continuación, se induce la lisis celular incubando durante 2 minutos a máxima potencia en un microondas (mantener el tubo abierto). Finalmente, se resuspende el lisado celular en 10 µl de agua desionizada estéril.

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1, añadiendo 15 µl de la mezcla de reacción a los 10 µl de lisado utilizado como molde de ADN.

### 3.1.6 Extracción de ARN de *G. intraradices*

Para extraer el ARN se utilizó el kit comercial “RNeasy Plant mini kit” (QIAGEN, Ref. 74904), aplicando una serie de modificaciones al protocolo comercial que se recogen y detallan a continuación:

- Se utilizó el tampón RLC como tampón de homogenización.
- Se utilizaron 600 µl de dicho tampón en vez de los 400 µl recomendados.
- Se realizó un doble tratamiento de DNasa, usando la DNasa del “RNase-Free DNase Set” (Qiagen, Ref. 79254) siguiendo el protocolo “RNA CleanUp” del kit “RNeasy Plant mini kit”.

### 3.1.7 Extracción de ARN de células microdisecionadas por láser

Para extraer el ARN de células microdisecionadas por láser se utilizó el kit comercial “PicoPure RNA Isolation” (Arcturus Engineering, Ref. KIT0204) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.1.8 Extracción de ARN de *O. sativa*

La extracción de ARN se realizó a partir de 0.5 g de peso fresco de raíz previamente congelada con N<sub>2</sub> líquido y almacenada a -80 °C, usando el método del fenol/SDS, seguido de una precipitación con LiCl, adaptado de Manickavelu y colaboradores (2007), tal como se describe a continuación:

- Homogeneizar en un mortero con nitrógeno líquido el material vegetal de partida.
- Añadir 800 µl de tampón REB<sup>\*1</sup> y homogeneizar.
- Dejar descongelar y añadir rápidamente 800 µl de una solución fenol<sup>\*2</sup>:cloroformo:isoamílico (50:24:1, v:v:v).

- Transferir el material a un tubo de 2 ml estéril y agitar por inversión varias veces. Mantener en hielo.
- Centrifugar 10 minutos a 15 000 g a 4 °C. Recoger la fase acuosa y añadirle 800 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, v:v:v).
- Centrifugar 10 minutos a 15 000 g a 4 °C. Recoger de nuevo la fase acuosa y añadirle 800 µl de cloroformo:isoamílico (24:1, v:v).
- Centrifugar 10 minutos a 15 000 g a 4 °C. Pasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 ml midiendo el volumen. Añadir 0.3 volúmenes de LiCl 8 M, poco a poco mientras que se agita con el vórtex a baja velocidad.
- Incubar durante toda la noche a 4 °C o durante 2-4 horas a -80 °C.
- Centrifugar 30 minutos a 20 000 g a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 300 µl de LiCl 2 M. Centrifugar de nuevo durante 10 minutos en las mismas condiciones.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de tampón TE<sup>3</sup>.
- Precipitar el ARN añadiendo 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2. Incubar toda la noche a -20 °C.
- Centrifugar 30 minutos a 20 000 g a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 300 µl de etanol al 75% y volver a centrifugar de nuevo 5 minutos en las mismas condiciones.
- Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado en un concentrador centrífugo tipo Speed-Vac®.
- Resuspender en 30-50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

---

**H<sub>2</sub>O DEPC:** 0.1% dietil-pirocarbonato (DEPC) en H<sub>2</sub>O. Agitar durante toda una noche. Autoclavar y agitar durante 30 minutos en una campana extractora para eliminar gases tóxicos.

<sup>\*1</sup>**Tampón REB:** 25 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 75 mM NaCl, 1% SDS, 1M β-mercaptoetanol. Esterilizar en autoclave todos los reactivos, a excepción del β-mercaptoetanol, que se añade justo antes de usarlo.

<sup>\*2</sup> **Fenol** = Fenol equilibrado con tampón citrato 0.1 M, pH 4.3

<sup>\*3</sup> **Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.

---

**Notas:** Usar guantes durante todo el proceso para evitar el contacto del ARN con ARNasas que puedan degradarlo. Todo el material utilizado ha de estar completamente estéril. Todos los reactivos se preparan en H<sub>2</sub>O DEPC y tienen que estar fríos en el momento de uso.

### 3.1.9 Tratamiento con DNasa

El protocolo que se detalla a continuación se utilizó para el ARN extraído de *O. sativa* y está adaptado para 20-40 µg de ARN total.

- Preparar la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µl:

X µl	20-40 µg de ARN
5 µl	10x DNase I Buffer
2 µl	Recombinant DNase I (RNase-free) (10 U) (Takara, Ref. 2270A)
1 µl	RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 U) (Invitrogen · Ref. 10777)

Completar con H<sub>2</sub>O DEPC hasta 50 µl.

- Incubar durante 30 minutos a 37 °C.
- Añadir 200 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y 250 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, v:v:v). Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 15 000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Transferir la fase superior a un nuevo tubo. Añadir 250 µl de cloroformo:isoamílico (24:1, v:v) y mezclar por inversión.
- Centrifugar a 15 000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir de nuevo la fase superior a un nuevo tubo. Añadir 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 0.25 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión e incubar durante toda la noche a -20 °C o durante 2-4 horas a -80 °C.
- Centrifugar a 20 000 g durante 30 minutos a 4 °C. Retirar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con etanol frío al 70% y centrifugar a 20 000 g durante 10 minutos a 4 °C.

- Retirar el sobrenadante y secar el precipitado en un concentrador centrífugo tipo Speed-Vac®.
- Finalmente, disolver el precipitado en 20-30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC y guardar a -80 °C.

### 3.2 Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos

#### 3.2.1 Cuantificación

Tanto el ADN obtenido, ya sea plasmídico o genómico, como el ARN se cuantificó mediante el uso del NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Además de la cuantificación, el NanoDrop™ nos proporciona una estimación de la pureza de nuestra muestra, en función de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Un valor menor de 1.8 para la relación 260/280 es indicativo de la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben en una longitud de onda próxima a 280 nm. Por otro lado, un valor menor de 2.0 para la relación 260/230 es indicativo de la presencia de EDTA, carbohidratos y/o fenol que absorben en una longitud de onda próxima a 230 nm.

#### 3.2.2 Visualización del ADN

La separación electroforética de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa al 0.7-2%, dependiendo del tamaño de las bandas, en tampón TAE\*<sup>1</sup>. Las muestras se prepararon en tampón de carga 1x\*<sup>2</sup>. La electroforesis se realizó en tampón TAE 0.5x a un voltaje constante de 100 V. La visualización del ADN en los geles se realizó mediante tinción con GelRed™ y exposición a luz UV (260 nm) en un equipo transiluminador (Bio-Rad · Gel Doc 2000).

---

\*<sup>1</sup>**Tampón TAE (50x):** 242.28 gr/l Tris (2 M), 57.1 ml/l ácido acético glacial (1 M), 18.61 g/l Na<sub>2</sub>EDTA (0.05 M) pH 8.5.

\*<sup>2</sup> **Tampón de carga (10x):** 50% sacarosa, 0.3% azul de bromofenol, preparado en tampón TAE 10x.

---

### 3.2.3 Visualización del ARN

Para determinar la calidad del ARN extraído se procedió a la separación electroforética de 0.5-1  $\mu\text{g}$  de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2% que contienen formaldehído al 1.85 % en tampón MOPS<sup>\*1</sup> 1x.

Las muestras se desnaturalizaron de la siguiente forma:

- Ajustar el volumen de la muestra de ARN a 8  $\mu\text{l}$  con H<sub>2</sub>O DEPC.
- Añadir 4  $\mu\text{l}$  de Tampón MOPS 10x, 20  $\mu\text{l}$  de formamida, 8  $\mu\text{l}$  de formaldehído y 0.5  $\mu\text{l}$  de EtBr (10 mg/ml).
- Incubar durante 10-15 minutos a 65 °C y posteriormente en hielo 1-2 minutos.
- Añadir el tampón de carga<sup>\*2</sup>.
- El ARN se separa electroforéticamente a 80 V. Por último, el RNA se visualiza mediante exposición a luz ultravioleta (Bio-Rad · Gel Doc 2000).

---

<sup>\*1</sup>**Tampón MOPS (10x):** 200 mM MOPS pH 7 ajustado con NaOH, 50 mM NaAc, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA. Todas las soluciones se preparan en H<sub>2</sub>O DEPC. Esterilizar en autoclave.

<sup>\*2</sup>**Tampón de carga (10x):** 50% sacarosa, 0.3% azul de bromofenol, preparado en tampón MOPS 10x.

**Nota:** La cubeta de electroforesis, el molde y el peine se incuban durante 15 minutos en solución desnaturalizante (1M NaOH y 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8), se lavan varias veces con agua desionizada y una con agua milliQ.

---

## 3.3 Manejo de ácidos nucleicos

### 3.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las mezclas de reacción se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante de las diferentes ADN polimerasas termoestables (Taq polimerasas) y se utilizó el programa recomendado para cada una de ellas. De forma general, la mezcla de reacción es la siguiente:

X µl	ADN molde (10-100 ng)
2.5 µl	Tampón Taq DNA polimerasa 10x
1.5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0.5 µl	10 mM dNTPs
0.5 µl	10 µM Cebador 5'
0.5 µl	10 µM Cebador 3'
0.1 µl	Taq polimerasa (5 U/µl)
Completar con H <sub>2</sub> O desionizada estéril hasta 25 µl.	

Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). El programa estándar de PCR consiste en incubación inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 50-60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Al final de la reacción se realizó una incubación (extensión final) a 72 °C durante 7 minutos.

Los diferentes cebadores usados en las diferentes PCRs realizadas en este estudio se recogen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Lista de cebadores usados**

Nombre	T <sub>M</sub> (°C)	Secuencia (5' → 3')	Uso
AMT2.1	50	GGIGYIITIGAYTTYGCIGG	Oligo degenerado AMTs
AMT2.2	50	CCNARCCANCCRAACCA	Oligo degenerado AMTs
AMT2.3	63	GCATATTGTATTAATTAGGAAAGAGA CACG	3' RACE GintAMT2
AMT2.4	63	CCTTGAATTACTTGACCACCTAAAGCT	5' RACE GintAMT2
AMT2.5	50	gcggccgcATGTCCACAGCTACA*	Ensamblaje GintAMT2 completo (* flanqueado 5' Not I)
AMT2.6	50	gcggccgcTAACTAAGTATATATTG*	Ensamblaje GintAMT2 completo (* flanqueado 3' Not I)
AMT2.7	-	AAAGGACGCAAAGCAGAATGAGAGAG	Paseo cromosómico
AMT2.8	58 60	AGTGCCAATGCCGCTAACATA	PCR cuantitativa GintAMT2 RT-PCR
AMT2.9	58 60	TGATGTACCTCCAACAATTCCA	PCR cuantitativa GintAMT2 RT-PCR
AMT2	58 60	TGTGTCAGCATTGTCTTCAGT	PCR cuantitativa GintAMT1 RT-PCR
AMT3	58 60	GGCAAGTGCGGGTGTAAATAG	PCR cuantitativa GintAMT1 RT-PCR

IV. MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL

GDH1	63	TTTTGGAGGAGCAAAAGGTG	3' RACE GintGDH
GDH2	63	AATCCAAGCCATTTCACGAG	5' RACE GintGDH
GDH3	58 60	GTACAGGGAGCAGAGGAACG	PCR cuantitativa GintGDH RT-PCR
GDH4	58 60	TTCCTGACCCTTCGTAAACA	PCR cuantitativa GintGDH RT-PCR
GiGOGAT1	63	GTTCGTAACAAACAACGTTCAAAGA	3' RACE GintGDH
GiGOGAT2	63	TAGTACAAACACTCCAATTTGATTCCAC	5' RACE GintGDH
GiGOGAT3	58 60	TTGAGACACGTCAAGGCAAA	PCR cuantitativa GintGOGAT RT-PCR
GiGOGAT4	58 60	TGATGAACTTGTGGTGCTTCA	PCR cuantitativa GintGOGAT RT-PCR
MtPT4f	60	TCGCGCGCCATGTTTGTGT	RT-PCR
MtPT4r	60	CGCAAGAAGAATGTTAGCCC	RT-PCR
GintPTf	60	AACACGATGTCAACAAAGCAAC	RT-PCR
GintPTr	60	AAGACCGATTCCATAAAAAGCA	RT-PCR
AMT1;1.F	60	ACCAATCCAGAACGAACGAC	PCR cuantitativa OsAMT1;1
AMT1;1.R	60	AGCCCAGCAAAAAGTGAAAGA	PCR cuantitativa OsAMT1;1
AMT1;2.F	60	CTTCATCGGGAAGCAGTCT	PCR cuantitativa OsAMT1;2
AMT1;2.R	60	TGAGGAAGGCGGAGTAGATG	PCR cuantitativa OsAMT1;2
AMT1;3.F	60	GAGATGGGAGGCCATGTCTA	PCR cuantitativa OsAMT1;3
AMT1;3.R	60	GTCAAATCCCCTGTCCAAA	PCR cuantitativa OsAMT1;3
AMT3;1.F	60	GTCACGCAGAACGTCTGATGA	PCR cuantitativa OsAMT3;1
AMT3;1.R	60	GTATACAACCCCAAAAAGGAAAGG	PCR cuantitativa OsAMT3;1
AMT3;3.F	60	CGAGCATCACCATCATCATC	PCR cuantitativa OsAMT3;3
AMT3;3.R	60	ATGACACCCCACTGGAAGAG	PCR cuantitativa OsAMT3;3
GOGAT1.F	60	GAAACAGGCAAACTTTTCAAGAC	PCR cuantitativa OsGOGAT1
GOGAT1.R	60	GCATTTACCATGCAAATCA	PCR cuantitativa OsGOGAT1
GOGAT2.F	60	GAAGGATGATGAAGGTGAAACC	PCR cuantitativa OsGOGAT2
GOGAT2.R	60	ATGGCCCTACTATCTTCGCAT	PCR cuantitativa OsGOGAT2
OsPT11.F	60	GAGAAGTTCCTGCTTCAAGCA	PCR cuantitativa OsPT11
OsPT11.R	60	CATATCCCAGATGAGCGTATCATG	PCR cuantitativa OsPT11
GintMST2F	58	GGCAGGATATTTGTCTGATAG	PCR cuantitativa GintMST2
GintMST2R	58	GCAATAACTCTTCCCGTATAC	PCR cuantitativa GintMST2
GintEF1 $\alpha$ .F	58 60	GCTATTTTGATCATTGCCGCC	Control interno de <i>G. intraradices</i> para PCR cuantitativa RT-PCR
GintEF1 $\alpha$ .R	58 60	TCATTAACCGTCTTCCGACC	Control interno de <i>G. intraradices</i> para PCR cuantitativa RT-PCR
OsEF1 $\alpha$ .F	58	GTCATTGGCCACGTCGACTC	Control interno de <i>O. sativa</i> para PCR cuantitativa
OsEF1 $\alpha$ .R	58	TGTTTCATCTCAGCGGCTTCC	Control interno de <i>O. sativa</i> para PCR cuantitativa



### 3.3.1.1 ADN Polimerasas utilizadas

ADN Polimerasa	Aplicación
<b>GoTaq® Flexi DNA Polymerase</b> (Promega, Ref. M830)	Polimerasa de rutina para realizar escrutinios o pruebas de especificidad de cebadores. El tampón de reacción también sirve de tampón de carga.
<b>Advantage® 2 PCR Enzyme System</b> (Clontech, Ref. 639201)	Mezcla de polimerasas para obtener amplicones de alta fidelidad compatibles para estrategias de clonaje del tipo TA Cloning.
<b>Pfu DNA Polymerase</b> (Promega, Ref. M7741)	Polimerasa para obtener amplicones de alta fidelidad. El tiempo de extensión recomendado es de 2 minutos por kb. No es compatible con estrategias de clonaje del tipo TA Cloning (ver apartado 3.3.2).
<b>SAHARA™ DNA polymerase</b> (Bioline, Ref. BIO-21088)	Polimerasa "Hot Start" para obtener amplicones de alta fidelidad que se encuentran en bajo número de copias. Compatible con estrategias de clonaje del tipo TA Cloning.

### 3.3.2 Adición de adenina al extremo 3' de productos de PCR

Algunas ADN polimerasas tienen actividad exonucleasa 3'→5', tal como el caso de las denominadas polimerasas correctoras de errores o polimerasas "proofreading". Estas ADN polimerasas se utilizan para obtener amplicones de alta fidelidad para estrategias de clonación, pero debido a la actividad exonucleasa dejan los amplicones con extremos romos, lo que resulta incompatible con la estrategia de clonación del tipo TA. Esto se puede solucionar utilizando mezclas de polimerasas o bien añadiendo de forma secundaria una adenina en el extremo 3' (3' A-overhand) para crear los extremos cohesivos compatibles con la estrategia de clonaje TA Cloning. La creación de estos extremos 3' A-overhands se denomina en inglés "A-tailing" y el proceso es el siguiente:

- Purificar el fragmento de PCR mediante el uso del kit "DNA Clean & Concentrator™ Kit (ZYMO Research, Ref. D4003), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si hubiera una mezcla de productos de PCR, primero habría que separarlos electroforéticamente (apartado 3.2.2) y

purificar el fragmento deseado tal como se describe en el apartado 3.4. En ambos casos el volumen de la elución final debe ser de 8  $\mu$ l.

- Una vez purificado, realizar la siguiente mezcla de reacción:

8 $\mu$ l	Fragmento de PCR purificado
1.5 $\mu$ l	Tampón Taq DNA polimerasa 10x
1 $\mu$ l	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 $\mu$ l	3 mM adenina (dATP)
0.5 $\mu$ l	GoTaq® Flexi DNA Polimerase (5 U/ $\mu$ l) (Promega, Ref. M830)

- Incubar durante 20 minutos a 70 °C.
- El fragmento obtenido con adenina en el extremo 3' se puede utilizar en estrategias de clonación del tipo TA tal como se describe en el apartado 3.5.4.

### 3.3.3 RACE

Para la obtención de la secuencia completa de aquellos genes de los que sólo se conocía una parte de la misma, se utilizaron técnicas de RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*). Con este fin se ha empleado el SMARTer™ RACE Amplification Kit (Clontech, Ref. 634923), siguiendo las instrucciones del fabricante con las dos modificaciones que se detallan a continuación:

- La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1  $\mu$ g de ARN total previamente tratado con DNasa. Posteriormente, se utilizaron 2.5  $\mu$ l de una dilución 1/10 del ADNc obtenido como molde para cada reacción de PCR.
- La temperatura a la que se realizó la hibridación se indica para cada cebador en la Tabla 4.

Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). El programa de PCR consistió en 38 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 63-67 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 3 minutos. Al final de la reacción se realizó una incubación (extensión final) a 72 °C durante 7 minutos.

En aquellos casos en los que la estrategia de 5'RACE del kit comercial de Clontech no produjo los resultados esperados, bien por el tamaño del extremo 5' o por la baja expresión del gen, se optó por usar la siguiente estrategia basada en la adición de una cola poliA al extremo 3' del ADNc, utilizando la enzima transferasa terminal. Se procedió de la siguiente forma:

- Realizar la retrotranscripción de 2-4 µg de ARN a ADNc mediante el uso de un cebador específico (antisentido) del gen problema y la retrotranscriptasa SuperScript™ III, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Purificar el ADNc usando el kit comercial "DNA Clean & Concentrator™ Kit (ZYMO Research, Ref. D4003), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, eluyendo el ADNc en un volumen final de 10 µl.
- Añadir una cola poliA al extremo 3' del ADNc mediante el uso de la terminal transferasa. La mezcla de reacción es la siguiente:

---

1.5 µl	Tampón de reacción 10x
1.5 µl	2.5 mM CoCl <sub>2</sub>
0.5 µl	10 mM dATP
1.5 µl	Terminal transferasa (30 U) (New England Biolabs · Ref. M0315S)
10 µl	ADNc

---

- Incubar durante 30 minutos a 37 °C. Desactivar la enzima mediante incubación durante 10 minutos a 70 °C.
- El ADNc obtenido se utiliza como molde (1-2 µl) para realizar una PCR utilizando el cebador utilizado para la síntesis del ADNc u otro más interno a ser posible, y el cebador 3'CDS suministrado en el kit comercial "SMARTer™ RACE Amplification Kit" (Clontech, Ref. 634923).

### 3.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN se utilizó el kit comercial “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (ZYMO Research, Ref. D4001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.5 Técnicas de clonación en vectores

#### 3.5.1 Vectores utilizados

##### # pCR 2.1 (Invitrogen)

Vector de clonación en *E. coli* que utiliza las adeninas del extremo 3' del amplicón resultantes de la actividad endonucleasa terminal de las ADN polimerasas sin actividad correctora de errores. El sitio de clonación se encuentra en el marco de lectura del gen LacZ $\alpha$ , lo que permite la selección de los plásmidos portadores del inserto mediante un escrutinio de colonias blancas/azules cuando se cultivan en presencia de X-Gal<sup>\*1</sup> y el inductor IPTG<sup>\*2</sup>. La selección se realiza por la resistencia al antibiótico ampicilina que confiere este plásmido.

---

<sup>\*1</sup>**X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido):** 50 mg/ml en DMSO o N,N'-dimetilformamida. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C protegido de la luz. Añadir 35  $\mu$ l a la placa.

<sup>\*2</sup>**IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido):** 100 mM IPTG, preparado en agua desionizada y esterilizado por filtración. Almacenar a -20 °C. Añadir 100  $\mu$ l a la placa.

---

##### # pFL61

Vector de expresión en *S. cerevisiae* de alto número de copias que contiene el origen de replicación del plásmido de 2 $\mu$ . El inserto se expresa bajo el control del promotor constitutivo de la fosfoglicerato kinasa (PKG)

(Minet et al., 1992). Este plásmido se puede replicar de forma estable en *E. coli*, a la que confiere resistencia a ampicilina. La selección de los transformantes en levadura se realiza mediante auxotrofia a uracilo. El plásmido fue suministrado por la Dra. Michèle Minet (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS F 91 190, Gif sur Yvette, Francia).

### 3.5.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción

La digestión de ADN con enzimas de restricción se realizó en las condiciones óptimas de tampón y temperatura, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

### 3.5.3 Desfosforilación de vectores de clonación

Para evitar la ligación entre dos moléculas de vector y su posible circularización, los vectores digeridos con endonucleasas de restricción se desfosforilaron mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP, del inglés *Calf Intestinal Phosphatase*). La mezcla de reacción es la siguiente:

---

X µl	1 µg vector digerido
4 µl	Tampón de reacción 10x (NEBuffer#3)
0.1 µl	CIP (1 U/µg vector) (New England Biolabs · Ref. M0290S)
X µl	Completar con H <sub>2</sub> O milliQ hasta 40 µl

---

Incubar durante 30 minutos a 37 °C. Desactivar la enzima mediante incubación durante 10 minutos a 70 °C.

### 3.5.4 Ligación de productos de PCR

Los productos de PCR se ligaron en el vector de clonación pCR2.1, contenido en el kit comercial "TA Cloning® Kit" (Invitrogen, Ref. K2020), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.5.5 Ligación de fragmentos de restricción

El producto de una digestión con extremos compatibles se incubó toda la noche a 16 °C con el vector linearizado y desfosforilado, como se indica en la siguiente mezcla de reacción:

---

X µl	150 ng de inserto
X µl	50 ng de vector desfosforilado
4 µl	Tampón de la ligasa T4 5x
1 µl	ADN Ligasa T4 (5 U)
	(Invitrogen · Ref. 15224)

Completar hasta 20 µl con agua milliQ

---

### 3.6 Paseo cromosómico

El aislamiento de las secuencias promotoras de los genes de interés se realizó utilizando el kit “BD GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, Ref. 638904)” siguiendo las instrucciones del fabricante, y partiendo de 2.5 µg de ADN genómico de *G. intraradices*. Para las PCRs se emplearon 5 ng de ADN digerido por reacción, utilizando el programa recomendado por el fabricante.

### 3.7 Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada). Las secuencias se determinaron mediante secuenciación de cadena única, usando un secuenciador automático 3130x/ Genetic Analyzer ABI Prism (Applied Biosystems). Cada reacción consistía de 100-250 ng de ADN molde (ADN plasmídico) y 1.6 pmoles de cebador.

### 3.8 Análisis de expresión génica

#### 3.8.1 Retrotranscripción del ARN: síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1-4 µg de ARN total, tratado con DNasa, usando la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Ref. 18080) y Oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen, Ref. 18418), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y que se detallan a continuación:

- Mezclar en un microtubo de 1.5 ml:

---

X µl	1-4 µg ARN total
1 µl	Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 µM) (Invitrogen · Ref. 18418)
1 µl	10 mM dNTPs

---

Completar con H<sub>2</sub>O MilliQ hasta 13 µl

---

- Calentar la mezcla a 65 °C durante 5 minutos y mantener posteriormente en hielo al menos 1 minuto.
- Añadir al tubo:

---

4 µl	First-Strand Buffer (5x)
1 µl	0.1 M DTT
1 µl	RNaseOUT™ (40 U) (Invitrogen · Ref. 10777)
1 µl	SuperScript™ III RT (200 U) (Invitrogen · Ref. 18080)

---

- Mezclar suavemente mediante pipeteo e incubar a 50 °C durante 60 minutos.
- Inactivar la reacción por calor a 70 °C durante 15 minutos.

### 3.8.2 PCR cuantitativa a tiempo real

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en el equipo iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El volumen final de reacción fue de 21  $\mu$ l y contenía:

10.5 $\mu$ l	iQTM SYBR Green Supermix 2x (Bio-Rad · Ref. 170-8882)
0.45 $\mu$ l	Cebador 5' 10 $\mu$ M (4.5 pmol)
0.45 $\mu$ l	Cebador 3' 10 $\mu$ M (4.5 pmol)
8.6 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	cDNA (generalmente, 5 ng)

El programa de PCR consistió en una incubación inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 38 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 58-60 °C durante 30 segundos (58 °C para genes del hongo y 60 °C para genes de la planta) y 72 °C durante 30 segundos. La fluorescencia emitida por el SYBR Green se midió al final de la extensión de cada ciclo.

La eficiencia de cada pareja de cebadores se determinó mediante una curva patrón de PCRs a tiempo real, para lo que se empleó como molde diluciones de ADN plasmídico (normalmente 4 diluciones comprendidas entre 20 y 0.02 ng) que contenía el amplicón a estudiar. Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuviera entre el 95 y el 105%.

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización o disociación del amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello se efectuó un protocolo de calentamiento desde 58 hasta 95 °C, incrementando la temperatura 0.5 °C cada ciclo de 30 segundos.

Las determinaciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo al menos en tres materiales biológicos independientes de dos experimentos diferentes. Las reacciones de cada muestra biológica se realizaron al menos tres veces,



determinando el ciclo umbral ( $C_t$ , del inglés *threshold cycle*) por duplicado. Solo se consideraron los  $C_t$  que presentaban una desviación estándar inferior a 0.3. Los niveles de transcripción relativos se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

### 3.8.3 RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR con el ARN obtenido de células microdisecionadas por láser se llevaron a cabo utilizando el kit comercial "One Step RT-PCR kit" (Qiagen, Ref. 210210), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma breve, todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a 50 °C (fase de retrotranscripción) y a continuación se incubaron 15 minutos a 95 °C, para la activación de la Taq polimerasa "HotStart" presente en la mezcla de reacción. Las reacciones de amplificación siguieron el siguiente programa: 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos.

## 4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

### 4.1 Extracción de microsomas de *G. intraradices*

Procedimiento:

- Triturar 600 mg de micelio con PVPP (10% p/p) en un mortero con  $N_2$  líquido y transferirlo a un tubo de centrifuga de 2 ml.
- Añadir tampón de homogeneización\*1 frío (v:p, 2:1).
- Homogeneizar la mezcla en hielo con ayuda de un pistilo.
- Transferir el lisado a una columna QIAshredder (QIAGEN, Ref. 79654) y centrifugar a 13 000 g durante 1 minuto a 4 °C.
- Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo y centrifugar a 13 000 g durante 15 minutos a 4 °C.
- Centrifugar el sobrenadante a 100 000 g durante 60 minutos a 4 °C (40 000 rpm en un rotor 50Ti).

- Retirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el sedimento en 40  $\mu$ l de tampón de resuspensión\*<sup>2</sup> frío y congelar rápidamente en N<sub>2</sub> líquido. Guardar a -80 °C.

---

\*<sup>1</sup> **Tampón de homogeneización:** 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM sacarosa, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 1 mM PMSF.

\*<sup>2</sup> **Tampón de resuspensión:** 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM sacarosa, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 1 mM PMSF.

---

#### 4.2 Extracción de microsomas de levadura

- Preparar un preinóculo de la cepa de interés en 15 ml de medio SD. Incubar en un agitador orbital a 30 °C durante aproximadamente 24 horas hasta que alcance la fase estacionaria ( $DO_{660} = 2-4$ ).
- Inocular con 1 ml del preinóculo un matraz de 1 litro con 200 ml de medio SD. Dejar crecer hasta fase exponencial tardía ( $DO_{660} = 0.5-0.7$ ; aproximadamente 16 horas).
- Recoger las células por centrifugación en un rotor Sorval SS-34 a 3 000 rpm durante 5 minutos.
- Lavar las células dos veces con H<sub>2</sub>O desionizada.
- Resuspender las células en 2.5 ml de tampón de lisis\*<sup>1</sup> frío y añadir 5 ml de cuentas de vidrio previamente enfriadas a 4 °C (0.5 mm  $\varnothing$ ; Sigma, Ref. G8772).
- Agitar con el vórtex durante 1 minuto tres veces, con intermedios de 30 segundos en hielo.
- Añadir 5 ml de GTED20\*<sup>2</sup> frío y mezclar bien. Centrifugar a 3 000 rpm en rotor SS-34 durante 15 minutos a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Lavar las cuentas de vidrio con 5 ml de GTED20 frío. Centrifugar de nuevo durante 15 minutos y transferir el sobrenadante al tubo del paso anterior.
- Centrifugar los sobrenadantes a 16 000 rpm en rotor SS-34 durante 1 hora a 4 °C.

- Resuspender el sedimento (microsomas) en 150  $\mu$ l de tampón GTED20 frío suplementado con PMSF 1 mM y 10  $\mu$ g/ml de pepstatina.
  - Congelar en N<sub>2</sub> líquido y almacenar a -80 °C.
- 

<sup>\*1</sup>**Tampón de lisis:** 150 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 15 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 2.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF.

<sup>\*2</sup> **GTED20:** 20 % Glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 1 mM DTT.

---

### 4.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976), que permite determinar espectrofotométricamente el contenido de proteínas mediante la medida del complejo que éstas forman con un colorante. Se empleó el reactivo comercial “*Dye Reagent Protein Assay*” (Bio-Rad, Ref. 500-0006) y albúmina de suero bovina (BSA) como proteína de referencia para preparar la curva patrón de proteínas. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

### 4.4 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas microsomales

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (N-dodecil sulfato sódico) se realizó según Laemmli (1970), usando 5-25  $\mu$ g de proteínas microsomales. Las proteínas se desnaturalizaron incubando a 65 °C durante 5 minutos en tampón de muestra<sup>\*1</sup> 1x e, inmediatamente después, se introdujeron en hielo.

El gel estaba compuesto por un gel separador al 10% de poliacrilamida y un gel concentrador al 4% de poliacrilamida con un grado de entrecruzamiento 37.5:1. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis<sup>\*2</sup> 1x a temperatura ambiente y un voltaje constante de 80 V (aproximadamente 1 hora), utilizando un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) para geles de 8.3 x 7.3 cm y 0.75 mm de espesor.

**Tabla 4. Preparación de los geles de poliacrilamida**

<b>Soluciones madre</b>	<b>Gel Separador 10%</b>	<b>Gel Concentrador 4%</b>
	(Inferior)	(Superior)
40% Acrilamida	2.43 ml	0.48 ml
2% Bis-acrilamida	1.34 ml	0.26 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.50 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.26 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O desionizada	3.58 ml	2.92 ml
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
<b>Volumen TOTAL</b>	10 ml	5 ml

<sup>\*1</sup>**Tampón de muestra 4x:** 12.5 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 ml glicerol, 2 g SDS, 2.5 ml  $\beta$ -ME o 250  $\mu$ l 2 M DTT y 10 mg de azul de bromofenol. Si es necesario, completar con H<sub>2</sub>O hasta 25 ml. Guardar en alícuotas de 0.5 ml a 4 °C.

<sup>\*2</sup>**Tampón de electroforesis 5x:** 15.1 g Tris, 72.0 g glicina y 5.0 g SDS. Llevar hasta 1 000 ml con H<sub>2</sub>O.

#### 4.5 Tinción de las proteínas en gel

La visualización de las proteínas separadas por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante tinción con Azul Coomasie. Para ello los geles se fijaron y tñieron directamente con *Coomassie Brilliant Blue R-250* al 0.25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v) durante 1-2 h en agitación, y se destñieron durante 3-5 h con metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v).

#### 4.6 Obtención y purificación de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales frente a GintAMT2 se obtuvieron frente a un oligopéptido sintético, correspondiente a una zona antigénica de la proteína, en conejo por la empresa Biomedal S.L. (Sevilla, España).

Tras un análisis de antigenicidad, el péptido seleccionado fue PLDDSMMLVENKYFPGD (aminoácidos 6-21), localizado en el extremo extracelular N-terminal de la proteína. El conejo se inmunizó con 0.8 mg del oligopéptido conjugado con Blue Carrier, con adyuvante de Freund completo, cada 15 días durante 2 meses (4 inmunizaciones). Transcurridos 75 días después de la primera inmunización se sacrificó el conejo, se recuperó el antisuero y se obtuvo la fracción IgG mediante cromatografía de intercambio iónico. Finalmente, los anticuerpos fueron purificados por afinidad al oligopéptido sintético mediante cromatografía, usando una resina recubierta con el antígeno (Biomedal S.L., Sevilla, España).

#### 4.7 Western Blot

##### 4.7.1 Transferencia de proteínas a la membrana

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Inmuno-Blot PVDF Membrane · Bio-Rad, Ref. 126-0177) en un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), utilizando las instrucciones del fabricante.

El procedimiento es el siguiente:

- Incubar el gel durante 15 minutos en tampón de transferencia\*.
- Incubar la membrana de PVDF, con un tamaño ligeramente superior al del gel, unos segundos en metanol absoluto hasta que esté translúcida; posteriormente en agua MilliQ y finalmente en tampón de transferencia durante 5 minutos.
- Preparar el sándwich de transferencia siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Realizar la transferencia a voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 1 hora a 4 °C en tampón de transferencia\*.

---

\***Tampón de transferencia (Towbin et al., 1979):** 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol (v/v).

---

### 4.7.2 Inmunodetección

- Incubar la membrana en solución de bloqueo\*<sup>1</sup> a temperatura ambiente y en agitación suave durante 1 hora.
- Lavar dos veces con PBS-T\*<sup>2</sup> durante 5 minutos.
- Incubar con el anticuerpo anti-GintAMT2 diluido 1:1 000 en una solución de BSA al 0.5% en PBS a 4 °C. La incubación se mantendrá durante toda la noche y con agitación suave.
- Lavar tres veces con PBS-T\*<sup>2</sup> durante 10 minutos.
- Incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo con actividad peroxidasa (Sigma, Ref. A6154) diluido 1:10 000 en una solución de BSA al 0.5% en PBS.
- Lavar dos veces con PBS-T\*<sup>2</sup> y una vez con PBS durante 15 minutos.
- La detección se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial de detección ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (Ge Healthcare · Amersham™, Ref. RPN2135), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

---

**PBS (10x):** Para 500 ml, añadir 40 g NaCl, 1 g KCl, 7.2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 450 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.3 y llevar a un volumen final de 500 ml. Esterilizar en autoclave.

\*<sup>1</sup>**Solución de bloqueo:** 5% BSA (p/v), 0.1% Tween20 (v/v) en PBS.

\*<sup>2</sup>**PBS-T:** Para 500 ml, mezclar 50 ml de PBS (10x) con 0.5 ml de Tween20; completar con agua desionizada.

---

## 5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

### 5.1 Fijación y preparación de muestras de micelio extrarradical de *G. intraradices*

Las muestras de micelio extrarradical, desarrollado en medio ML en el CH de una placa compartimentada, se tomaron con pinzas y se fijaron en una solución al 4% de paraformaldehído (PFA\*<sup>1</sup>) en PBS pH 7.3. El protocolo de fijación es el siguiente:

- Sumergir las muestras en el fijador y someter a vacío durante 1 minuto.
  - Incubar toda la noche a 4 °C.
  - Lavar tres veces con PBS durante 10 minutos.
  - Conservar las muestras a 4 °C en una solución de PFA al 0.1% en PBS.
- 

**\*Solución PFA:** Para 50 ml, disolver 2 g de paraformaldehído en PBS pH 7.3. Calentar en agitación sin superar los 60 °C. Si no se vuelve transparente ajustar el pH a 7.3 con NaOH. Hacer alícuotas y congelar a -20 °C.

---

## 5.2 Inmunofluorescencia en micelio *G. intraradices*

### 5.2.1 Montaje de las muestras

Procedimiento:

- Si se utilizan muestras almacenadas en 0.1% de PFA en PBS, lavar dos veces durante 10 minutos con PBS pH 7.3 y dos veces con agua MilliQ durante 5 minutos.
  - Colocar las muestras en los pocillos de un portaobjetos recubierto de APTES\* y dejar secar para que las muestras se queden adheridas.
- 

**\*Recubrimiento de portaobjetos con APTES.** Brevemente, sumergir los portaobjetos limpios y desengrasados en una solución al 2% de APTES (Sigma, Ref. A3648) en acetona durante 2 minutos, lavar dos veces con agua MilliQ durante otros dos minutos y dejar secar resguardados del polvo.

---

### 5.2.2 Permeabilización de las muestras

Procedimiento:

- Someter a un ciclo de deshidratación-rehidratación con series de metanol en PBS (30%, 50%, 70%, 100%, 70%, 50%, 30%, 0%). Para ello añadir 30 µl de cada dilución a cada uno de los pocillos y dejar incubar 5 minutos.

- Retirar el PBS y añadir 30  $\mu$ l de quitinasa\* 1x en PBS para digerir parcialmente la pared celular del hongo. Incubar 60 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Retirar la disolución anterior e incubar con una solución de Triton X-100 al 0.3% en PBS durante 20 minutos a 37 °C en cámara húmeda.

---

\***Quitinasa 3x.** Solución de quitinasa (5 U/ml) en PBS pH 7.3 (Sigma · Ref. C6137). Almacenar a -20 °C.

---

### 5.2.3 Inmunodetección

Procedimiento:

- Lavar tres veces con PBS durante 5 minutos.
- Bloquear con 30  $\mu$ l de una solución de BSA al 5% en PBS. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Retirar la solución de bloqueo e incubar en un volumen final de 25  $\mu$ l con el anticuerpo anti-GintAMT2 diluido 1/50 en 1% BSA en PBS durante 60 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Lavar tres veces con una solución de BSA al 1% en PBS durante 5 minutos.
- Bloquear de nuevo con 30  $\mu$ l de una solución de BSA al 5% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Retirar la solución de bloqueo e incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Alexa Fluor568 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen · Ref. A-11036) diluido 1/25 en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad, para evitar que decaiga la fluorescencia.
- Lavar tres veces con PBS durante 5 minutos.
- Incubar en oscuridad con una solución 1x de WGA\*<sup>1</sup> para teñir las estructuras fúngicas, durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad.
- Lavar dos veces con PBS y una vez con agua MilliQ durante 5 minutos.



- Incubar en oscuridad con una solución 1x de DAPI<sup>2</sup>, para teñir los núcleos, durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad.
- Lavar tres veces con agua MilliQ durante 5 minutos.
- Montar en MOWIOL 4-88<sup>3</sup>.
- Observar al microscopio de fluorescencia o confocal.

---

<sup>\*1</sup> **WGA 20x.** Solución 1 mg/ml de WGA (Wheat Germ Agglutinin) conjugado con Alexa Fluor 488® (Invitrogen · Ref. W11261) en PBS pH 7.3. Almacenar a -20 °C en oscuridad.

<sup>\*2</sup> **DAPI 100x.** Solución 100 µg/ml de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma · Ref. D9542) en agua MilliQ. Almacenar a -20 °C en oscuridad.

<sup>\*3</sup> **Mowiol 4-88:** Disolver 2.4 g de Mowiol 4-88 (Fluka, Ref. 81381) en 12 ml de glicerol al 50%. Agitar durante dos horas a temperatura ambiente. Añadir 12 ml de 0.2 M Tris-HCl pH 8.5, incubar a 50 °C agitando ocasionalmente hasta que se disuelva el Mowiol (~ 3 h). Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 µm, hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.

---

### 5.3 Microdissección láser

Las secciones de raíces, procedes del sistema "sándwich", fueron fijadas e incluidas en parafina de acuerdo a las indicaciones de Balestrini y colaboradores (2007). El equipo utilizado para recolectar células corticales colonizadas por arbusculos, a partir de secciones de raíces incluidas en parafina, fue Leica AS LMD (Leica Microsystem, Inc.), tal como se describe en Balestrini y colaboradores (2007).

## 6. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

### 6.1 Búsqueda de secuencias de interés en bases de datos

Con el fin de encontrar genes implicados en el transporte y metabolismo de N en *G. intraradices* y *O. sativa*, se analizaron las bases de datos públicas de ESTs o de ADN genómico de ambos organismos (*Glomus* Genome

Consortium, <http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/GlomerusGenome/>; *Oryza sativa* genome database, <http://www.plantgdb.org/OsGDB/>). Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con las secuencias aminoacídicas de genes de otros organismos disponibles en las bases de datos usando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) disponible en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 6.2 Análisis y manejo de secuencias

El manejo, alineamiento y ensamblaje de las diferentes secuencias obtenidas de las bases de datos, o mediante estrategias de clonación, se realizó mediante el uso del paquete bioinformático DNASTar versión 7.0 (Lasergene).

## 6.3 Análisis de promotores

Dado que no existen bases de datos de motivos de unión de factores de transcripción en hongos MA, para estudiar la presencia de dichos motivos en la región no codificante del extremo 5' del gen *GintAMT2* de *G. intraradices*, descrito en esta Tesis Doctoral, se utilizó la base de datos online SCPD de promotores de *S. cerevisiae* (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>; Zhu and Zhang 1999).

## 6.4 Predicción de la topología de proteínas transmembrana

La identificación *in silico* de dominios transmembrana se hizo mediante el algoritmo TMHMM (Sonnhammer et al., 1998), incluido en la aplicación online InterProScan disponible en el EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>; Hunter et al., 2009).

La representación gráfica de la topología de la proteína, obtenida mediante dicho algoritmo, se realizó mediante la aplicación online TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>; Spyropoulos et al., 2004).

### **6.5 Diseño de cebadores de PCR**

Los cebadores se diseñaron empleando la aplicación online Primer3 (Versión 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

### **6.6 Análisis filogenético de proteínas**

Las distancias genéticas entre proteínas relacionadas se estimaron usando el método dos parámetros de Kimura (K2P), mediante el programa informático MEGA5 (Tamura et al., 2011a).

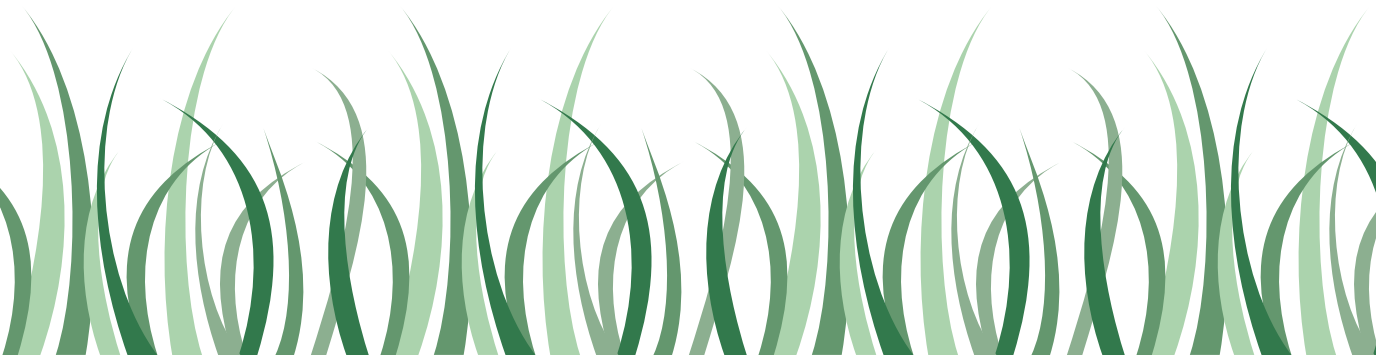
## **7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Los resultados relativos al crecimiento de las plantas, determinaciones bioquímicas o analíticas, así como los datos de expresión génica se sometieron a un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas como consecuencia de los tratamientos aplicados, se procedió a calcular estas mediante el test MDS (Mínima Diferencia Significativa) de Fisher ( $P \leq 0.05$ ), el test de Rango Múltiple de Duncan o el test de Tukey mediante el software estadístico SPSS.



**NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation pathways in the arbuscular  
mycorrhizal fungus *Glomus intraradices***

V





## 1. Introduction

Although N is present in the soil as a complex mixture of organic and inorganic compounds, ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) are by far the main sources for nutrition of most species of higher plants (Williams and Miller, 2001). Plants are in fact completely dependent on N availability in the soil solution for their growth and productivity (Gobert and Plassard, 2008). N is often the major limiting macronutrient for plants because the concentrations of these two ions in the soil solution are generally low and fluctuant, therefore the plants have developed strategies to increase their capacity for N mobilization. One strategy is the symbiotic association with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi which play a crucial role in the growth and development of the plant.

In contrast to phosphorus, fewer studies have considered the role of AM fungi in N acquisition, because the greater mobility of  $\text{NH}_4^+$  and especially of  $\text{NO}_3^-$  ions in soil compared to phosphate, led to the assumption that little benefit was to plants from enhanced N uptake. However, there is increasing evidence that AM fungi have the potential to take up and transfer significant amounts of N to the host plant (George et al., 1992; Johansen and Jensen, 1996). Total N uptake by the extraradical mycelia (ERM) has been observed to account for 21% to over 50% of total root N in different mycorrhizal *in vitro* systems (Toussaint et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005). Moreover, Tanaka and Yano (2005) reported that 75% of the N in leaves of mycorrhizal maize was taken up by the ERM of *Glomus aggregatum*. In addition, AM fungi can apparently also transfer N from one plant to another (Bethlenfalvay et al., 1991; Cheng and Baumgartner, 2004; He et al.,

2009) and can enhance decomposition of and increase N capture from complex organic material in soil (Hodge et al., 2001; Leigh et al., 2009).

The ERM of AM fungi are able to take up and assimilate various forms of N, such as  $\text{NH}_4^+$  (George et al., 1992; Frey and Schüepp, 1993; Johansen et al., 1996),  $\text{NO}_3^-$  (Tobar et al., 1994; Bago et al., 1996; Johansen et al., 1996) and amino acids (Hawkins et al., 2000; Hodge et al., 2001) from their surroundings, to translocate N to the intraradical mycelium (IRM) and then release N to the host plants (Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005). Although AM fungi are able to take up both  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , a clear preference for  $\text{NH}_4^+$  has been demonstrated (Villegas et al., 1996; Toussaint et al., 2004), which is explained, at least in part, by the extra energy the fungus must expend in reducing  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NH}_4^+$  before it can be incorporated into organic compounds (Marzluf 1996). N transfer to the plant may also be higher when  $\text{NH}_4^+$  rather than  $\text{NO}_3^-$  is supplied to the fungal hyphae (Tanaka and Yano, 2005) even though N is likely transferred from the external to the internal AM hyphae as arginine (Govindalajuru et al., 2005; Cruz et al., 2007; Tian et al., 2010) before transfer to the plant as  $\text{NH}_4^+$  (Guether et al., 2009b). However, very little is known about the mechanisms of  $\text{NH}_4^+$  uptake in AM fungi.

Until now two genes encoding  $\text{NH}_4^+$  transporters have been described from Glomeromycota genomes: *GintAMT1* (López-Pedrosa et al., 2006) and *GintAMT2* (Pérez-Tienda et al., 2011). Both genes were identified in *Glomus intraradices* and functionally complement corresponding mutant yeast strains. The apparent  $K_m$  of *GintAMT1* has been evaluated in yeast to be in the micromolar range characteristic of a high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter. While the existence of multiple genes suggests the existence of different  $\text{NH}_4^+$  transport systems in AM fungi, the kinetics and energetics of  $\text{NH}_4^+$  transport in these organisms have not yet been determined. The aim of the present work was to study the mechanisms of  $\text{NH}_4^+$  transport in the AM fungus *G. intraradices* through the physiological characterization of the  $\text{NH}_4^+$  uptake systems operating in the ERM. Data provided in this study show for the first time the existence of active high- and low-affinity  $\text{NH}_4^+$  transport systems in the ERM of an AM fungus.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures and treatments*

Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures consisted of Ri T-DNA (*Agrobacterium rhizogenes*)-transformed carrot (*Daucus carota* L. clone DC2) roots colonized with the AM fungus *G. intraradices* (synonym of *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198; Krüger et al., 2012). Cultures were established in bi-compartmental Petri plates to allow separating the root compartment (RC) from the hyphal compartment (HC) (St-Arnaud et al., 1996). Cultures were started by placing a mycorrhizal carrot root segment in the RC containing M medium (Chabot et al., 1992). Petri plates were incubated in the dark at 24 °C until the HC, which contained M medium without sucrose (M-C medium), was profusely colonized by the fungus (approximately 6 weeks). The content of the HC was then removed and replaced by liquid M-C medium (15 ml). The mycelium was allowed to colonize this medium over the subsequent 2 weeks. Petri dishes were examined regularly and roots were trimmed as required to prevent crossing into the HC. Only cultures with vigorous roots and densely colonized HC were selected for the experiments.

### 2.2 $\text{NH}_4^+$ uptake measurements

$\text{NH}_4^+$  uptake by the ERM was determined by measuring the influx of  $^{15}\text{NH}_4^+$  (Cerezo et al., 2001). ERM from the HC compartment of six monoxenic cultures were used for each measurement. Briefly, the culture medium of the HC was replaced by fresh medium 24 h before doing the measurements. Then, the medium was replaced by 0.1 mM  $\text{CaSO}_4$  and the ERM were incubated 1 min at room temperature. This solution was replaced by  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx solution: N-free liquid M-C medium with  $^{15}\text{N}[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  (99 atom %  $^{15}\text{N}$ ; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) at different concentrations. After 3 min incubation in the influx solution, ERM were incubated 1 min in cold 0.1 mM  $\text{CaSO}_4$ . ERM were then collected with forceps, dried with filter paper, placed in cleaned tin capsules and oven-dried for 48 h at 65 °C. The  $^{15}\text{N}$  content of the ERM was determined by mass



spectrometry (Clarkson et al., 1996) using an integrated system for continuous-flow isotope ratio mass spectrometry (Euro-EA elemental analyser, EuroVector S.P.A.) and isoprime mass spectrometer (GV Instruments Ltd.). The values of the ERM  $^{15}\text{N}$  influx are expressed in  $\mu\text{mol } ^{15}\text{N}$  (g ERM dry weight (DW)) $^{-1} \text{ h}^{-1}$ . The experiments were repeated at least three times and the mean  $\pm$  SE is shown ( $n \geq 3$ ).

### 2.3 Kinetics of $\text{NH}_4^+$ influx

The kinetics of  $\text{NH}_4^+$  uptake as a function of external  $\text{NH}_4^+$  concentration ( $[\text{NH}_4^+]_o$ ) were measured in ERM with  $[\text{NH}_4^+]_o$  ranging from 2  $\mu\text{M}$  to 25 mM. Eadie-Hofstee diagrams were obtained by plotting  $\text{NH}_4^+$  flux ( $v$ ) versus the  $\text{NH}_4^+$  flux - substrate concentration ratio ( $v/S$ ). The  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  values were determined for the saturable portion of  $\text{NH}_4^+$  uptake from the Lineweaver-Burk transformation using SigmaPlot software (Jandel Scientific).

### 2.4 External pH effect

Prior to the  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx measurements, the liquid medium of the HC (pH 5.5) was replaced with fresh liquid M-C medium adjusted at pH values of 4.5, 5.5, 6.5 and 7.5 with 10 mM MES-TRIS, and the ERM were incubated during 24 hours at 24 °C. The  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx solutions, containing either 10  $\mu\text{M}$  or 2 mM  $[\text{NH}_4^+]_o$  to assay, respectively, the activities of the high-affinity system (HATS) and low-affinity transport system (LATS), were adjusted to the same pH values than the liquid M-C mediums with 10 mM MES-TRIS.

### 2.5 Metabolic inhibitor studies

$^{15}\text{NH}_4^+$  influx measurements were performed after 30 min incubation in M-C liquid medium supplemented, or not, with the inhibitors dissolved in ethanol (2 ml/l medium) to obtain final concentrations of 10  $\mu\text{M}$  CCCP (carbonycyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone) or 50  $\mu\text{M}$  2,4-DNP (2,4-dinitrophenol). The control plates only received the medium with ethanol. The HATS and LATS activities were measured in 10  $\mu\text{M}$  and 2 mM  $[\text{NH}_4^+]_o$  influx solutions, respectively.

## 2.6 Effect of acetate

Prior to the  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx measurements, the liquid medium of the HC was replaced with fresh liquid M-C medium supplemented with 4 mM acetate during 48 h at 24 °C. The HATS and LATS activities of the acetate treated ERM were measured in 10  $\mu\text{M}$  and 2 mM [ $^{15}\text{NH}_4^+$ ]<sub>o</sub> influx solutions, respectively.

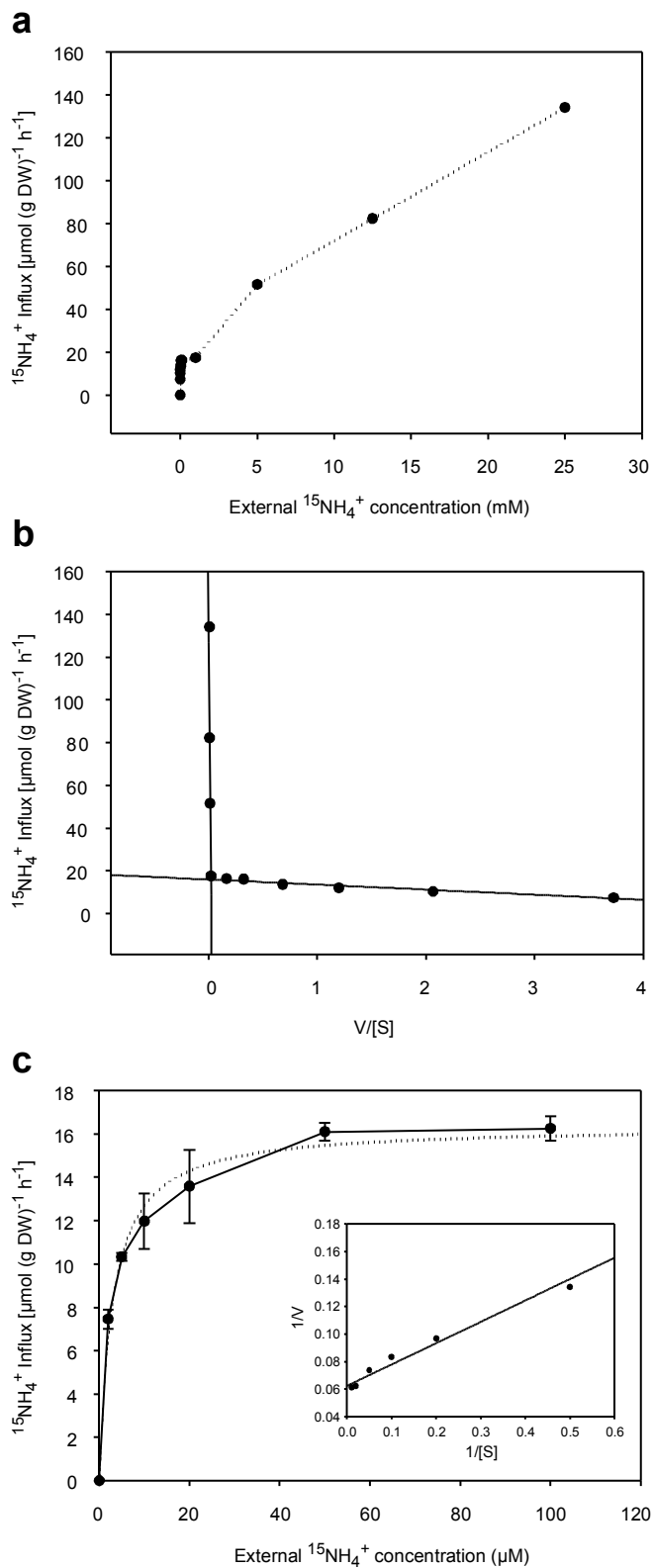
## 2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the IBM SPSS 18.0 software support. The data are expressed as means  $\pm$  SE. Mean values were compared by a Fisher's LSD (least significant difference) test. Differences were taken into account only when they were significant at least at the 5% level. All experiments were repeated at least three times.

# 3. Results

## 3.1 Kinetics of $^{15}\text{NH}_4^+$ uptake by the *G. intraradices* ERM

$^{15}\text{NH}_4^+$  uptake increased with increasing substrate concentration over the concentration range of 0.002 to 25 mM [Figure 8A]. Over this range, uptake did not appear to saturate and, thus, did not conform to simple Michaelis-Menten kinetics. Eadie-Hofstee plots ( $v$  against  $v/S$ ) showed that uptake over the 0-25 mM range was biphasic [Figure 8B], indicating the existence of two components in the uptake of  $\text{NH}_4^+$  by *G. intraradices*. When the external  $^{15}\text{NH}_4^+$  concentrations were below 100  $\mu\text{M}$  (Figure 8C),  $\text{NH}_4^+$  uptake fits a Michaelis-Menten curve typical of the activity of a saturable high-affinity transport system (HATS). However, at concentrations above 1 mM the uptake rate was directly proportional to the external  $^{15}\text{NH}_4^+$  concentrations, indicating the action of a non-saturable LATS. Values for Michaelis-Menten parameters of the HATS were estimated from the Lineweaver-Burk transformation within the range 0-100  $\mu\text{M}$  [Figure 8C]. The estimated  $K_m$  concentration was  $2.53 \pm 0.25$   $\mu\text{M}$  with a  $V_{\max}$  of  $16.58 \pm 0.81$   $\mu\text{mol (g ERM DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



◀ **Figure 8.** Uptake of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by *G. intraradices* ERM as a function of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration: (A) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in the range 0.002-25 mM (B) Eadie-Hofstee plot of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in a substrate range of 0.002 to 25 mM. (C) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in the range 2-100 μM, inset shows the corresponding Lineweaver-Burk plot. Values are means ± SE (n≥3).

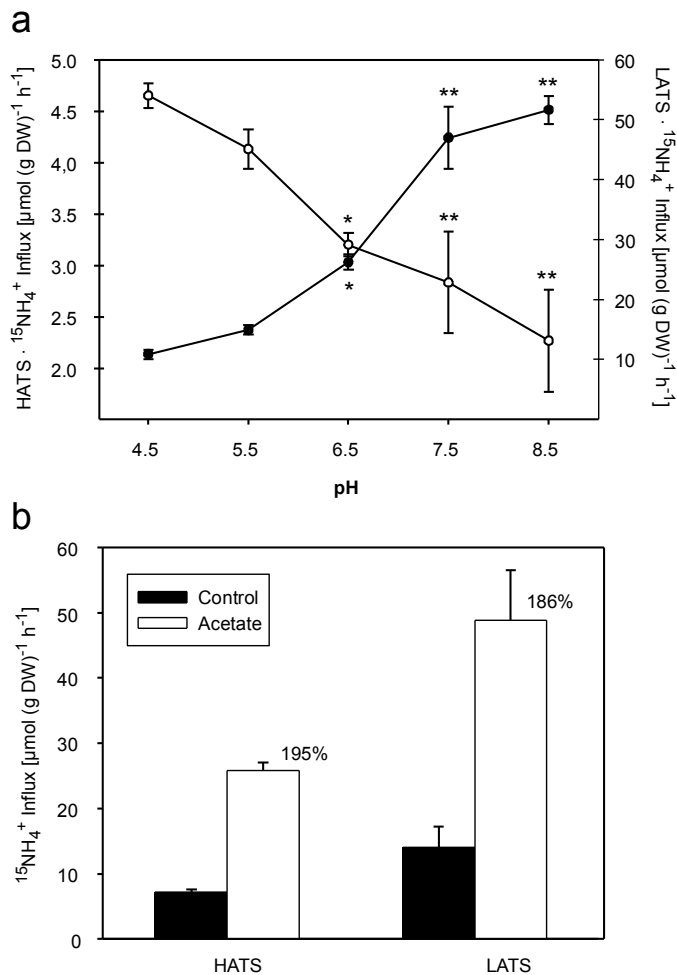
### 3.2 Energetics of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake

The two components of the biphasic system of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake of *G. intraradices* were further characterized by assessing their sensitivity to external pH and metabolic inhibitors. External <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations of 10 μM and 2 mM were selected to assay the activity of the HATS and LATS, respectively. Although both the HATS and the LATS-mediated <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx were dependent on external pH, maximum activity of the HATS was observed at pH 4.5 while influx by the LATS increased with external pH reaching the maximum activity at pH 8.5 [Figure 9A].

The effect of the protonophore CCCP and of the ATP-synthesis inhibitor 2,4-DNP on <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake was also tested. CCCP is a compound that depletes the proton-motive force by increasing H<sup>+</sup> influx and thereby induces acidification of the cytosol (Kasianowicz et al., 1984). Both the HATS and the LATS-mediated <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influxes were reduced after the application of the metabolic inhibitors, although the HATS was more sensitive than the LATS. Relative to the control treatments, the HATS was reduced 70 and 86% by CCCP and 2,4-DNP, respectively, while inhibition of the LATS by both inhibitors was about 40% (Table 6).

Treatment	HATS		LATS	
	μmol (g ERM DW) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	% of level without inhibitor	μmol (g ERM DW) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	% of level without inhibitor
Control	6.94 ± 0.46	100	25.62 ± 1.70	100
CCCP	2.08 ± 0.22	30	11.53 ± 0.55	45
2,4-DNP	0.98 ± 0.13	14	10.55 ± 0.59	41

**Table 6.** Effect of various inhibitors on <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx into *G. irregulare* ERM. <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx measurements were performed after 30 min incubation in fresh liquid M-C medium supplemented, or not, with 10 μM CCCP or 50 μM 2,4-DNP. The HATS and LATS activities were measured in 10 μM and 2 mM <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx solutions, respectively. Data are means of three independent experiments ± SE.



▲ **Figure 9. (A)** Effect of pH on  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx into *G. intraradices* ERM.  $^{15}\text{NH}_4^+$  uptake was measured in influx solution containing  $10 \mu\text{M}$   $^{15}\text{NH}_4^+$  for the HATS ( $\circ$ ) or  $2 \text{ mM}$   $^{15}\text{NH}_4^+$  for the LATS ( $\bullet$ ) at various pHs. Values are means  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ). \*\*: Statistically significant ( $P < 0.01$ ) and \*: ( $P < 0.05$ ) in comparison to the control value at pH 5.5 according to the Fisher's LSD test. **(B)** Effect of acetate on  $^{15}\text{NH}_4^+$  uptake by *G. intraradices* ERM.  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx measurements were performed 48 h after incubation of the ERM in fresh liquid M-C medium supplemented, or not, with  $4 \text{ mM}$  acetate. The HATS and LATS activities were measured in  $10 \mu\text{M}$  and  $2 \text{ mM}$   $^{15}\text{NH}_4^+$  influx solutions, respectively. Values are means  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ).

### 3.3 Regulation of $^{15}\text{NH}_4^+$ uptake by acetate

To determine if a carbon supply could regulate  $\text{NH}_4^+$  influx, the *G. intraradices* ERM was exposed to acetate, a carbon form taken up and assimilated via acetyl CoA and the glyoxylate cycle by the ERM (Pfeffer et

al., 1999). Exposure of the fungus to 4 mM acetate for 48 h activated  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx mediated by both the HATS and LATS [Figure 9B].

#### 4. Discussion

The external AM fungal mycelium is the fungal phase which is in contact with the soil and thus responsible for nutrient acquisition and transport to the internal mycelium inside the roots before any transfer to the plant occurs. However, despite the obvious importance of the ERM in nutrient acquisition, current knowledge of the nutrient uptake processes taken place in the ERM is poor. The obligate biotrophic nature of these fungi, which makes it impossible to cultivate them in the absence of a host root; and the traditional cultivation systems of AM, which add the difficulty of working with AM ERM from soil, have hampered these studies. These two problems have been overcome with the use of AM monoxenic cultures in two-compartmented Petri dishes (St-Arnaud et al., 1996). Although such *in vitro* system is an artificial system for studying AM physiology (especially the role of the host plant), it has been proven to be useful for investigating fungal transport (Rufyikiri et al., 2005) since it allows eliminating the complications arising from the uptake and metabolism of nutrients by other microorganisms and avoiding the diffusion of soluble nutrients between the compartments. In this work by using this *in vitro* system and isotopically-labeled  $\text{NH}_4^+$ , we have shown for the first time that uptake of  $\text{NH}_4^+$  by the ERM of *G. intraradices* is mediated by at least two functionally distinct systems, a low-affinity non-saturable and a high-affinity saturable component.

The concentration-dependent kinetics of  $\text{NH}_4^+$  uptake shows that at concentrations below 1 mM  $\text{NH}_4^+$ , uptake is mediated by a saturable transport system whose kinetic parameters are typical of a high affinity and low capacity transport system (von Wirén and Merrick, 2004). The HATS of *G. intraradices* with a  $K_m$  value of  $2.53 \pm 0.25$   $\mu\text{M}$  has a very high affinity for  $\text{NH}_4^+$ . Transport systems with very high affinity for  $\text{NH}_4^+$  have been also reported in other fungi, such as *Laccaria bicolor* ( $K_m$  6  $\mu\text{M}$ ; Jongbloed et al., 1991), *Saccharomyces cerevisiae* ( $K_m$  1-10  $\mu\text{M}$ ; Marini et al., 1994, 1997) and

*Agaricus bisporus* ( $K_m$  3.7  $\mu\text{M}$ ; Kersten et al., 1999). Given that these systems are adapted to transport at low concentrations of external  $\text{NH}_4^+$ , the saturable HATS of *G. intraradices* should allow the ERM to absorb sufficient N ( $\text{NH}_4^+$ ) from very low levels in the soil. Comparison of values for Michaelis-Menten parameters of the HATS with those obtained in several plant species shows that the  $K_m$  of the HATS of *G. intraradices* is at least 5-fold less than that of various investigated plant species whose  $K_m$  values ranged between 10 and 170  $\mu\text{M}$  (Glass and Siddiqui, 1995). Although caution must be taken when comparing kinetic values from different studies, these data suggest that the  $\text{NH}_4^+$  HATS of *G. intraradices* has higher affinity than that of plants, which might account for the increased  $\text{NH}_4^+$  uptake of mycorrhizal roots (Frey and Schüepp, 1993). At concentrations above 1 mM the uptake rate by the *G. intraradices* ERM was directly proportional to the external  $^{15}\text{NH}_4^+$  concentrations, indicating the action of a non-saturable LATS. However, given that  $\text{NH}_4^+$  concentrations in soil solutions rarely exceed 50  $\mu\text{M}$  (Marschner 1995) and that the LATS contribute to total uptake only at substrate concentrations  $>1$  mM, uptake mediated by the LATS is likely to be of little importance in most natural soils.

As in other filamentous fungi investigated so far, uptake of  $\text{NH}_4^+$  in *G. intraradices* displays characteristic features of active transport. Inhibition of the HATS and to a lesser extent of the LATS by the ionophore CCCP and the ATP-synthesis inhibitor DNP indicates that, although a diffusion-like component contributes to total uptake, both transport systems are dependent on metabolic energy and on the electrochemical  $\text{H}^+$  gradient. Similar inhibitory effects of CCCP and 2,4-DNP have been demonstrated for  $\text{NH}_4^+$  uptake by other fungi, such as *Paxillus involutus* (Javelle et al., 1999). Inhibition of the *G. intraradices*  $\text{NH}_4^+$  transport systems by CCCP indicates that  $\text{NH}_4^+$  uptake by the ERM is dependent on the activity of a plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase and supports the occurrence of a secondary transport system such as  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  symport (Ortiz-Ramirez et al., 2011). Previous studies have shown that AM fungi have several  $\text{H}^+$ -ATPases expressed in their ERM (Ferrol et al., 2000; Requena et al., 2003). Energization required for  $\text{NH}_4^+$  uptake could be performed by one of these isozymes.

Our kinetic studies, however, do not establish whether  $\text{NH}_4^+$  transport is mediated by a single transporter or whether it results from the activity of multiple transport proteins. In previous work, we have shown that *G. intraradices* expresses in the ERM two genes, *GintAMT1* (López-Pedrosa et al., 2006) and *GintAMT2* (Pérez-Tienda et al., 2011) that encode  $\text{NH}_4^+$  permeases belonging to the ammonium transporter/methylamine permease/rhesus (AMT/Mep/Rh) protein family (Andrade and Einsle, 2007). The apparent  $K_m$  of *GintAMT1* has been evaluated in yeast to be 26  $\mu\text{M}$ , characteristic of a high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter, and its transport activity was dependent on the ATPase activity. Therefore, the observed active component of  $^{15}\text{NH}_4^+$  uptake that obeyed Michaelis-Menten kinetics at concentrations below 100  $\mu\text{M}$  is likely mediated by *GintAMT1*. Although the kinetic properties of *GintAMT2* could not be determined, it was also proposed to encode a high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter that was functionally different from *GintAMT1*. Moreover, a new as yet uncharacterized  $\text{NH}_4^+$  transporter has been recently identified in the *G. intraradices* transcriptome (Tisserant et al., 2012). Multiplicity of  $\text{NH}_4^+$  transporters is also found in other fungi. For example,  $\text{NH}_4^+$  uptake by *S. cerevisiae* involves at least three permeases (Marini et al., 1994, 1997) and four in *Aspergillus nidulans* (Monahan et al., 2002, 2006). The presence of at least three ammonium transporters with different affinities has been reported for the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle et al., 2001, 2003a), and genome database screening has also identified 16 putative AMT/MEP systems in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Lucic et al., 2008). Functional and electrophysiological analyses of the different members of the *G. intraradices*  $\text{NH}_4^+$  transporter gene family will enable identification of the transport protein responsible of the active transport activity of the LATS and will provide further insights on the energetic coupling of the different *G. intraradices* AMTs.

Exposure of the fungus to acetate, a carbon form taken up by the ERM (Pfeffer et al., 1999), activated  $^{15}\text{NH}_4^+$  influx mediated by the HATS and LATS. In this sense, it has been recently reported that an exogenous supply of glucose to germinated spores of *G. intraradices* also enhances uptake and metabolism of different exogenous nitrogen sources (Jin et al., 2011). Since in



the symbiotic stage AM fungi obtain their carbon mainly within the host root, activation of the ERM  $\text{NH}_4^+$  uptake by acetate suggests that the plant might regulate fungal N influx by providing carbon to the fungus. This hypothesis is supported by the recent report that the carbon supply from the plant to the fungus across the symbiotic interface is a key trigger for N uptake and transport in the symbiosis (Fellbaum et al., 2012). However, these authors found that the uptake of acetate via the ERM had no significant effect on N transport to the root. These data suggest that the extra N taken up by the ERM as a consequence of the activation of N influx by acetate is retained in the fungus for its own metabolism.

In conclusion, data provided in this study show for the first time the existence of active high- and low-affinity  $\text{NH}_4^+$  transport systems in the ERM of an AM fungus. Although in recent years there has been a significant increase in our understanding of the physiological and molecular mechanisms of nitrogen transport in the AM symbiosis, further research is needed to identify the transport protein responsible of the active transport activity of the LATS and to determine the regulatory mechanisms of nitrogen transport in the symbiosis.

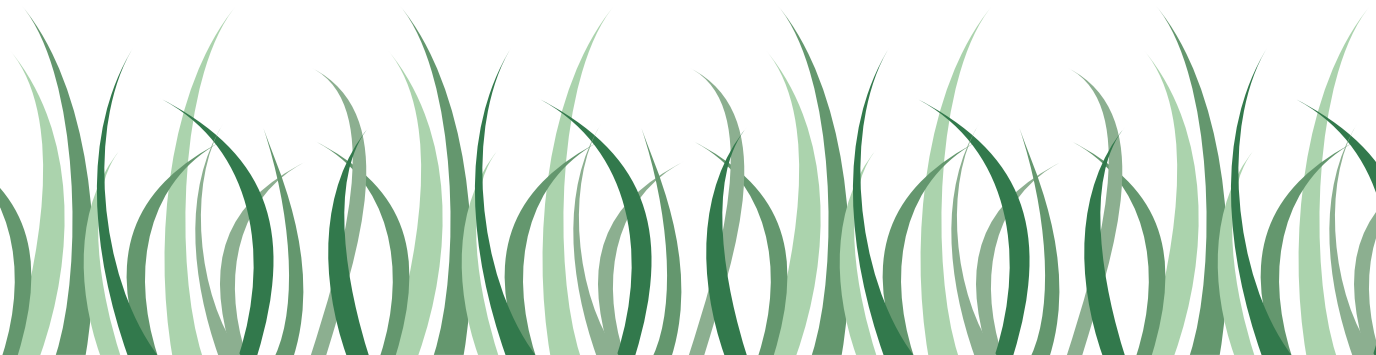
Capítulo basado en:

Pérez-Tienda J, Valderas A, Camañes G, García-Agustín P, Ferrol N (2012) Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* 22:485-491



**GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices***

VI





## 1. Introduction

Under natural conditions the roots of most vascular plants form arbuscular mycorrhiza, an ancestral type of mutualistic plant-fungal interaction, which is based on the bi-directional exchange of nutrients between both symbiotic partners (Wang and Qiu, 2006; Ferrol and Pérez-Tienda, 2009). Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, belonging to the monophyletic phylum Glomeromycota (Schüßler et al., 2001), are obligate biotrophs that depend entirely on the plant for their carbon supply (Bago and Bécard, 2002). In return, the fungus supplies the plant with mineral nutrients directly taken up from the soil by the extraradical mycelium (Smith and Read, 2008).

Although the uptake of inorganic phosphate (Pi) from the soil is considered to be the key physiological process by which AM fungi improve plant growth (Bucher, 2007), there is increasing evidence that AM fungi also play an important role in plant nitrogen (N) nutrition (He et al., 2003). In fact, N uptake by the extraradical mycelium (ERM) can account for more than 30% of total plant N uptake (Frey and Schüepp, 1993; Tanaka and Yano, 2005). The extraradical hyphae of AM fungi are able to take up and assimilate both inorganic (nitrate and ammonium) and organic N forms from the soil, and to translocate N from these different sources to the plant (Tobar et al., 1994; Hawkins et al., 2000; Govindarajulu et al., 2005). Moreover, AM fungi can accelerate the decomposition and transfer of substantial amounts of N to their host plant from organic material (Hodge et al., 2001; Leigh et al., 2009), playing an important role in N turnover in ecosystems.

N is a major nutrient for all organisms, being needed for the synthesis of many compounds, including amino acids, purines, pyrimidines, some carbohydrates and lipids, enzyme cofactors and proteins, all of which are essential for growth processes. In the fungal partner, a few studies have highlighted the importance of N both in the asymbiotic and symbiotic stages. It has been recently shown that although the spores of AM fungi are able to take up and assimilate inorganic and organic forms of N, they do not depend on exogenous N to germinate since they can remobilize their internal N sources (Gachomo et al., 2009). Moreover, germination and growth of the germ tube of *Gigaspora margarita* spores were shown to be stimulated by nitrate, and a role for N on polyphosphate accumulation in the germ tubes has been proposed (Yao et al., 2010). In the symbiotic stage, low N levels induced changes in fungal development and hyphal morphogenesis, leading to a well organized and economic developmental pattern (Bago et al., 2004). Despite the importance of N for both the plant and the fungal partners, current knowledge on the mechanisms of N transport and metabolism in the symbiosis is scarce.

The first molecular evidence for N uptake by AM fungi was obtained through the characterization of an ammonium transporter of *Glomus intraradices* (López-Pedrosa et al., 2006). More recently, an amino acid transporter (Cappellazzo et al., 2008) and a nitrate transporter (Tian et al., 2010) have been also described in *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, respectively. Once inside the fungus, inorganic N is assimilated in order to be used for internal consume or to be translocated towards the host root. Radiotracer experiments and gene expression analyses have demonstrated that: (i) inorganic N taken up by the extraradical hyphae is assimilated through the GS/GOGAT cycle, asparagine synthase and the urea cycle, (ii) arginine is the main form in which N is transported from the extraradical to the intraradical mycelium (IRM), and (iii)  $\text{NH}_4^+$  released from transported arginine through the catabolic arm of the urea cycle is the N form transferred to the host (Breuninger et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005; Cruz et al., 2007; Guether et al., 2009a; Kobae et al., 2010b; Tian et al., 2010).

Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) is a primary N source for plants and microorganisms and a key metabolite in N metabolism. Although AM fungi are able to take up both  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , a clear preference for  $\text{NH}_4^+$  has been demonstrated (Villegas et al., 1996; Hawkins et al., 2000; Toussaint et al., 2004), which is explained, at least in part, by the extra energy the fungus must expend in reducing  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NH}_4^+$  before it can be incorporated into organic compounds (Marzluf, 1996). Given the central role  $\text{NH}_4^+$  plays in N metabolism and in N transport processes in AM, the aim of our work was to characterize AM fungal proteins involved in  $\text{NH}_4^+$  uptake to get further insights into the regulatory mechanisms of N transport in the symbiosis. Transport of  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes is mediated by  $\text{NH}_4^+$  transporters of the ammonium transporter/methylamine permease/rhesus (AMT/Mep/Rh) protein family (TC#1.A.11), which is spread throughout the whole tree of life (Andrade and Einsle, 2007). In a previous study, we identified the first AMT in an AM fungus: GintAMT1, a *G. intraradices* high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter involved in  $\text{NH}_4^+$  uptake by the extraradical mycelium from the surrounding environment when present at low concentrations (López-Pedrosa et al., 2006). Here, we report the cloning and characterization of a new *G. intraradices* AMT that seems to be functionally different to GintAMT1.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures and treatments

Arbuscular mycorrhizal monoxenic cultures consisted of Ri T-DNA (*Agrobacterium rhizogenes*)-transformed carrot (*Daucus carota* L. clone DC2) roots colonized with the AM fungus *Glomus intraradices* DAOM 197198 (synonym of *Rhizophagus irregularis*; Krüger et al., 2012). Cultures were established in bi-compartmental Petri plates to allow separating the root compartment from the hyphal compartment (St-Arnaud et al., 1996).

Cultures were started by placing a mycorrhizal carrot root segment in the root compartment (RC) containing M medium (Chabot et al., 1992). Petri plates were incubated in the dark at 24 °C until the hyphal compartment (HC), which contained M medium without sucrose (M-C medium), was profusely colonized by the fungus (approximately 6 weeks). The content of

the HC was then removed and replaced by liquid M-C medium (15 ml) containing either 3.2 mM (100% N) or 0.8 mM (25% N)  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  losses, resulting from the reduction of  $\text{NO}_3^-$  salts, were compensated by the addition of the corresponding  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  salts, respectively. The mycelium was allowed to colonize this medium over the subsequent 2 weeks. Petri dishes were examined regularly and roots were trimmed as required to prevent crossing into the HC. Only cultures with vigorous roots and densely colonized hyphal compartments were selected for the experiments. At this point, the medium was removed and replaced by fresh liquid M-C medium without  $\text{NO}_3^-$ . The time of medium exchange was referred as time 0 for the N starvation treatment, and mycelia were harvested 2 and 7 days later. For the N re-supply experiments, mycelia grown in 25% N media and N-starved for 48 h were supplemented with different N sources and concentrations or water (control plates). Casein hydrolysate (N-Z amine HD; Sigma) was used as amino acid mixture. Extraradical mycelia were harvested 24 and 48 h later.

For the carbon-supplementation experiments, three different treatments were prepared: (1) mycelia from the HC of a control plate (liquid M-C medium), (2) mycelia from the HC of a control plate supplemented with 4 mM acetate in the HC, and (3) mycelia from the HC of a control plate supplemented with 25 mM glucose in the RC. Mycelia were harvested 2 and 7 days after supplementation.

In all experiments, mycelia were collected with forceps, rinsed with sterilized water, dried with sterilized filter paper, immediately frozen in liquid N and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

To analyze intraradical gene expression, hyphae growing in the HC were used as a source of mycorrhizal inoculum. Carrot roots were placed on top of a densely colonized HC and collected 15 days later. Extraradical hyphae attached to the roots were removed with forceps under a binocular microscope. Roots were then frozen in liquid N and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used. Spores of the AM fungus *G. intraradices* were collected from the HC of monoxenic cultures by blending the culture medium in 10 mM sodium citrate (pH 6) and sieving. The spores were recovered with a pipette under a

binocular microscope. Spores were immediately frozen in liquid N and stored at -80 °C until used.

### 2.2. Nucleic acids extraction and cDNA synthesis

Total genomic DNA was extracted from *G. intraradices* ERM developed in a control plate using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from extraradical mycelia from the different treatments, spores of *G. intraradices*, and mycorrhizal carrot roots using the Plant RNeasy Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed using RNA-free DNase Set (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The RNA samples were routinely checked for DNA contamination and their integrity was examined with Experion (Bio-Rad). cDNAs were obtained from 1 µg of total DNase-treated RNA in a 20 µl reaction containing 200 units of Super-Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and 50 pmol oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Isolation of the GintAMT2 gene

Two degenerated primers AMT2.1 and AMT2.2 (Table 4, chapter 3), designed in base to conserved motifs present in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters of other organisms, were used for PCR amplification of first strand cDNA from extraradical mycelia of *G. intraradices* grown in M-C medium. The PCR product was cloned in the pCR2.1 vector (Invitrogen). Sequence analysis of positive clones allowed identification of a 173 bp cDNA fragment with high homology to previously described fungal AMTs. The full-length cDNA sequence was obtained by RACE using the SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. The primers used for the 3' and 5'RACE reactions were AMT2.3 and AMT2.4 (Table 4), respectively. PCR products were cloned into pCR2.1 vector and sequenced.

The genomic and the full-length cDNA clones of *GintAMT2* were obtained by PCR amplification of *G. intraradices* genomic DNA and cDNA, respectively, using a set of primers flanking the complete open reading



frame (AMT2.5 and AMT2.6; Table 4). PCR products were cloned into the pCR2.1 vector and sequenced. For yeast complementation assays the full-length cDNA clone of *GintAMT2* was subcloned into the pFL61 vector (Minet et al., 1992).

To isolate the 5' non-coding sequence of *GintAMT2*, four GenomeWalker libraries were constructed using the GenomeWalker kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's manual. *G. intraradices* genomic DNA was digested to blunt ends with *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* and *StuI*. Each pool of DNA fragments was then ligated to the GenomeWalker Adaptor and upstream genomic regions were amplified from each library using a nested adaptor primer and the gene-specific primer AMT2.7 (Table 4). PCR products were cloned into the pCR2.1 vector and sequenced.

#### 2.4. Sequence analyses

Sequence analyses were performed using the DNASTar Lasergene software package (DNASTar, INC.), BLASTX algorithm available from the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul et al., 1997) and ClustalW2 algorithm available at EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>; Larkin et al., 2007). The protein family domains and functional sites were searched using the InterProScan available from EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>; Hunter et al., 2009). Transmembrane domains of *GintAMT2* were predicted by using TMHMM algorithm (Sonnhammer et al., 1998), included in InterProScan. Genetic distances were estimated by using the Kimura's two-parameter method employed by MEGA5 (Tamura et al., 2011a). The promoter sequence was screened for the presence of cis-regulatory elements using the available tools on the web of The Promoter Database of *S. cerevisiae* (SCPD) (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>; Zhu and Zhang, 1999).

#### 2.5. Heterologous expression of *GintAMT2* in yeast

To prove the functionality of *GintAMT2*, the open reading frame was cloned into the *NotI* site of the yeast expression vector pFL61 under de control of the constitutive yeast phosphoglycerate kinase (PGK) promoter to

yield the pFL61-*GintAMT2* construct (Minet et al., 1992). The fidelity of the construct was verified by sequencing.

The *Saccharomyces cerevisiae* triple *mep* mutant 31019b ( $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$ ; Marini et al., 1997) was transformed with the empty pFL61 vector (negative control) or the pFL61-*GintAMT2* construct according to Gietz and Schiestl (2007). pFL61-*GintAMT1* was used as positive control (López-Pedrosa et al., 2006). Selection of transformed yeasts was done by autotrophy to uracil on solid N-deficient medium (2% Agar, 0.17% YNB w/o amino acids and ammonium sulphate (Difco), supplemented with 3% glucose and 0.1% arginine as the sole N source, buffered to pH 6.1 with 50 mM Mes/Tris. For growth assays, yeast transformants were grown in liquid N-deficient medium until OD<sub>600</sub> reached 0.6-0.8. Cells were harvested, washed twice, resuspended in water to a final OD<sub>600</sub> of 2, and 10  $\mu$ l drops corresponding to a serial of 10-fold dilutions were spotted on solid N-deficient medium supplemented with different NH<sub>4</sub>Cl concentrations as the sole N source (0.1, 0.5, 1 and 5 mM). Yeast cells were also spotted on the 1 mM NH<sub>4</sub>Cl-supplemented medium buffered at different pH with 50 mM Mes/Tris. The pictures were taken 3 days after the plates were incubated at 30 °C. Uptake experiments of <sup>14</sup>C-labeled methylamine-HCl were performed according to López-Pedrosa et al. (2006).

## 2.6. Real-Time quantitative RT-PCR

Real-Time RT-PCR experiments were run on an iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Gene-specific primers were used to amplify *GintAMT1* (AMT2/AMT3; López-Pedrosa et al., 2006) and *GintAMT2* (AMT2.8 and AMT2.9; Table 4) in the synthesized cDNAs. Real Time RT-PCR reactions were carried out in a final volume of 20  $\mu$ l containing 10  $\mu$ l of iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 2x (Bio-Rad), 0.2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ l of a 1:10 dilution of cDNA template. The PCR program consisted in an initial incubation at 95 °C for 3 min, followed by 36 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, where the fluorescence signal was measured. The specificity of the PCR amplification procedure was checked with a heat-dissociation protocol (from 58 to 95 °C) after the final

cycle of the PCR. The efficiency of the primer sets was evaluated by performing real-time PCR on several dilutions of DNA. The results obtained for the different treatments were standardized to the elongation factor 1-alpha (*GintEF1 $\alpha$* ) gene levels (Benabdellah et al., 2009). Real Time RT-PCR determinations were performed on at least two independent biological samples from two replicate experiments. Real Time RT-PCR reactions were carried out three times for each biological sample, with the threshold cycle (Ct) determined in duplicate. Only Ct values leading to a Ct mean with a standard deviation below 0.3 were considered. The relative levels of transcription were calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Schmittgen and Livak, 2008). Data were subjected to ANOVA and then to Fisher's protected least-significant difference (PLSD) or Duncan's multiple range tests when appropriate by using SPSS.

### 2.7. Antibody production

A rabbit polyclonal anti-GintAMT2 antibody was produced from a 16 amino acids synthetic peptide designed from the deduced amino acid sequence of GintAMT2 (Biomedal, Sevilla, Spain). The selected peptide was PLDDSMMLVENKYFPGD (amino acids 6-21), located at the extracellular N-terminus of the protein. The serum was analyzed for the presence of antibodies that recognized the peptide by protein gel blot analyses. The antibodies were then purified by affinity chromatography using an affinity resin containing the peptide (Biomedal, Sevilla, Spain). The affinity purified antibodies cross-reacted with immunoblots of the GintAMT2 peptide (data not shown), whereas the antibodies pre-blocked with the synthetic peptide (1:3, v:v) showed no cross-reaction.

### 2.8. Isolation of microsomes

A microsomal protein fraction of *G. intraradices* was extracted as previously described (Benabdellah et al., 2009). Briefly, extraradical mycelium of *G. intraradices* was homogenized with a pestle and mortar in a cold homogenization buffer (1:2, w:v) consisting of 25 mM Tris-Cl pH 7.5, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF and 10% PVPP (w/v). The

homogenate was loaded on a QIAshredder spin column (Qiagen) and centrifuged at 13 000 g for 15 min at 4 °C. The flow-through was centrifuged at 40 000 rpm (Beckman 50Ti rotor) for 1 h at 4 °C min to sediment the “total membrane fraction”. The pellet was resuspended in keeping buffer containing 2 mM Tris-Cl pH 7.5, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA pH 8 and 1 mM PMSF, and stored at -80 °C until analysis.

Yeast microsomal proteins were extracted as described by Pérez-Castiñeira et al. (2002) with minor modifications. Briefly, cells were grown in selective medium, collected by centrifugation, resuspended in cold homogenization buffer (150 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 15 mM EDTA pH 8, 2.5 mM DTT and 0.5 mM PMSF), and disrupted with glass beads by vortexing for 1 min three times with intervals of 30 s on ice. Cell homogenates were diluted 1:4 (v:v) with ice-cold GTED20 buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT, 20% glycerol, 5 µg/ml pepstatin and 5 µg/ml chymostatin) and centrifuged for 15 min at 3 000 rpm (Sorvall SS-34 rotor). The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 16 000 rpm (Sorvall SS-34 rotor) to sediment the microsomes. The pellet was resuspended in 150 µl of ice-cold GTED20 buffer supplemented with 1 mM PMSF and 10 µg/ml pepstatin and stored at -80 °C until analysis.

Protein contents were determined using the Bradford assay (Bradford, 1976), with bovine serum albumin (BSA) as standard.

### 2.9. SDS/PAGE and Western-blot analysis

Microsomal membrane proteins were incubated at 65 °C for 15 min in SDS-PAGE sample buffer, separated by 10% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a PVDF membrane by electroblotting. Blots were blocked in blocking solution (5% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS) for 1 h at room temperature under gentle agitation on an orbital shaker, washed twice with PBS-T (PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20) and incubated overnight with a 1:1 000 dilution of the affinity purified anti-GintAMT2 in PBS containing 0.5% (w/v) BSA at 4 °C under gentle agitation. After washing three times in PBS-T, the membrane was incubated with a 1:10 000 dilution

peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) in PBS containing 0.5% (w/v) BSA for 1 h at room temperature. Finally, the membrane was washed twice with PBS-T for 15 min and once with milli-Q water, and detected using the ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham), following the manufacturer's instructions.

### 2.10. Immunolocalization of GintAMT2

Freshly harvested extraradical mycelium from the hyphal compartment of a control plate was immediately fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS. After vacuum infiltration, fixation was performed overnight at 4 °C. The fixed samples were hand sectioned using a double-edged razor blade. Sections were washed three times in PBS and left to dry onto APTES (Sigma)-coated multiwell slides for 1 h at room temperature. After fixation, samples were firstly permeabilized by dehydration-rehydration through a graded series of methanol (5 min each at 30, 50, 70 and 100% methanol in PBS, and 70, 50, 30 and 0% methanol in PBS). A second permeabilization step was the partial digestion of the fungal cell walls with 0.05 units chitinase from *Streptomyces griseus* (Sigma) in 30 µl PBS for 30 min at 37 °C. After digestion, samples were treated with 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS at 37 °C for 10 min, washed three times with PBS (5 min each), and blocked with 5% (w/v) BSA in PBS at room temperature for 30 min. The slides were incubated for 1 h at 37 °C in a humid chamber with the affinity purified anti-GintAMT2 (1:50 in PBS containing 1% BSA). After three washes with 1% (w/v) BSA in PBS (5 min each) and blocking with 5% (w/v) BSA in PBS at room temperature for 10 min, slides were exposed to secondary antibodies (Alexa Fluor568 anti-rabbit IgG; Molecular Probes) applied 1:25 in PBS for 45 min at room temperature in the dark. After five more washings in PBS (5 min each), samples were incubated in 0.05 mg/ml WGA conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) in PBS for 30 min at room temperature in the dark to stain the fungal wall. Finally, samples were washed twice with PBS (5 min each) and once with milli-Q water, counterstained with DAPI (1µg/ml in water) for 10 min at room temperature in the dark, washed twice with milli-Q water (10 min each) and mounted with Mowiol 4-88 (Polysciencies).

Observations were performed on a confocal laser scanning microscope (CLSM) (Leica TCS-SP2-AOBS) at the appropriate channels of excitation and emission corresponding to DAPI (to visualize the nuclei), WGA-Alexa 488 (to visualize the fungal wall), and Anti-GintAMT2-Alexa 568 (to visualize the immunofluorescence signal). Z-series of optical sections of 0.5 to 1.0  $\mu\text{m}$  intervals were collected. Images were taken from the projection of series of 15-20 optical sections. Differential Interference Contrast (DIC, Nomarski) images were also taken.

### 2.11. Laser microdissection (LMD)

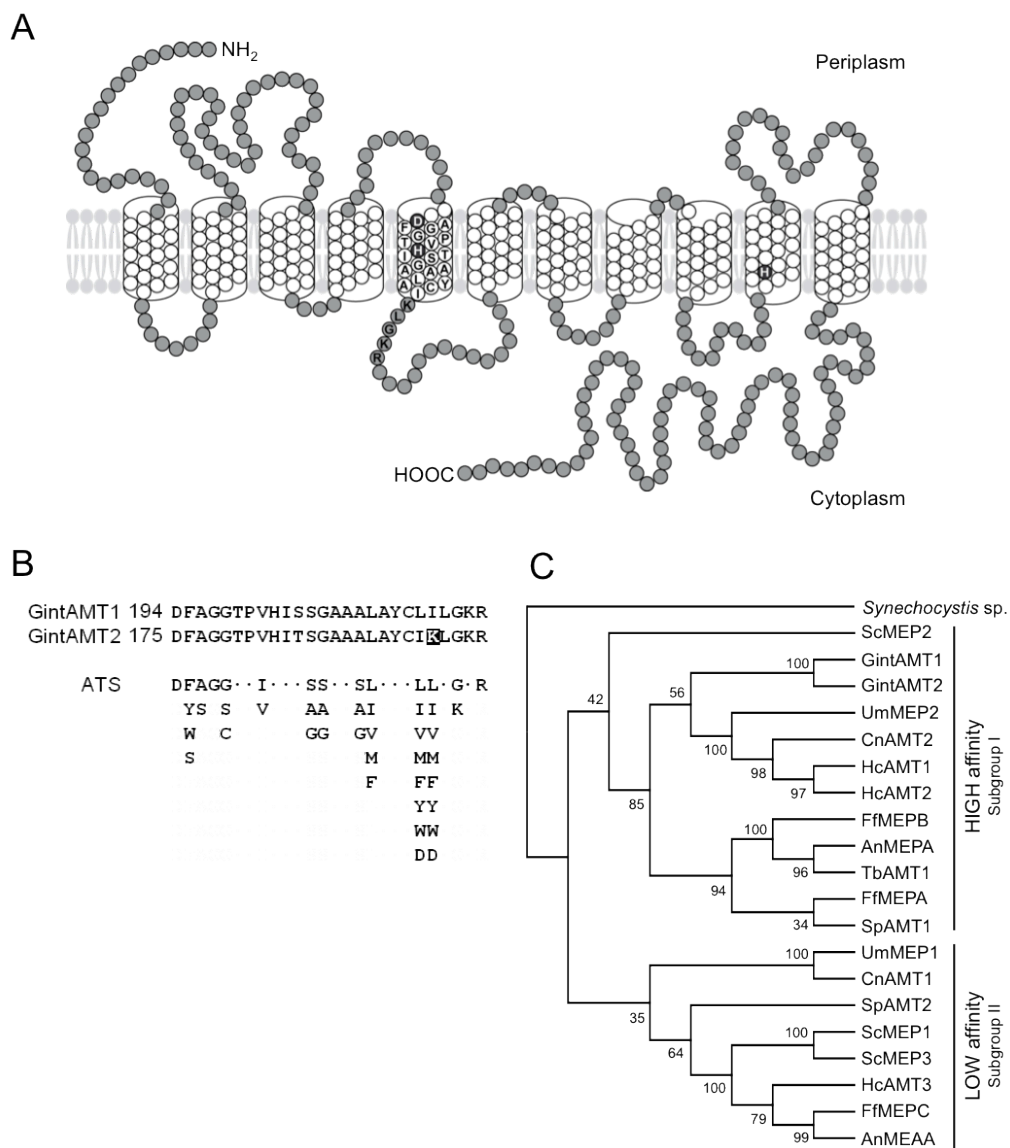
*Medicago truncatula* seedlings were inoculated with *G. intraradices* using the Millipore sandwich method described by Guether et al. (2009a). Mycorrhizal roots were dissected into about 5 mm pieces and placed in RNase-free tubes containing freshly prepared Farmer's fixative (absolute ethanol/glacial acetic acid, 3:1, v:v). After a step under vacuum at room temperature for 20 min, fixative solution was changed and root samples were incubated at 4 °C overnight. Roots were subsequently dehydrated in a graded series of ethanol (50, 70, 90, 100 and 100% in sterilized water) followed by two incubations with Neoclear® (Merck), with each step on ice for 30 min. Neoclear® was gradually replaced with paraffin (Paraplast Plus; Sigma). In detail, about 10 Paraplast Plus chips were added to 20 ml of fresh Neoclear® and samples were leaved for two hours at room temperature and then for 3 h at 58 °C. Once the chips dissolved at 58 °C, the mixture was replaced with molten Paraplast Plus at 58 °C, and the medium was changed twice approximately at 4-5 h intervals before embedding in pure paraffin. Root samples were embedded in paraffin in Petri dishes and stored at 4 °C. A Leica AS LMD system (Leica Microsystem, Inc) was used to collect arbuscule-colonized cortical cells from paraffin root sections as described by Balestrini et al. (2007). RNA was extracted following the Pico Pure kit (Arcturus Engineering) protocol. DNase treatment was performed using RNA-free DNase Set (Qiagen) in Pico Pure column, following the manufacturer's instructions. RNA was then quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer. All RT-PCR assays were carried out using the One Step RT-PCR kit (Qiagen). DNA contamination in RNA samples was evaluated using *GintEF1 $\alpha$*  specific primers of *G. intraradices*. For the RT-PCR

analyses, the samples were incubated for 30 min at 50 °C, followed by 15 min of incubation at 95 °C. Amplification reactions were run for 40 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s using the *GintAMT1* and *GintAMT2* specific primers used for the real-time PCR assays, and specific primers for the mycorrhiza-specific plant phosphate transporter *MtPT4* (Zocco et al., 2011) and the fungal phosphate transporter *GintPT* (Table 4). The RT-PCR experiments were conducted on two independent biological replicates. The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis.

### 3. Results

#### 3.1. Sequence analysis of *GintAMT2*

A *G. intraradices* full-length cDNA clone showing high similarity to previously described AMT genes from other fungi was isolated. This gene (GenBank Accession No. FM993985) was named *GintAMT2* according to the nomenclature proposed for AM fungal genes (Franken 2002). The full-length cDNA contains an open reading frame of 1413 nucleotides, a 5' untranslated region of 206 bp and a 3' untranslated region of 96 bp. The deduced protein has a length of 471 amino acids with a calculated molecular mass of 50 kDa. *In silico* analysis of protein topology reveals 11 transmembrane domains in the deduced amino acid sequence of *GintAMT2* according to the prediction of the TMHMM algorithm, with an extracellular N-terminus and a cytosolic C-terminus [Figure 10A]. This structure is typical of the Mep/AMT proteins (Thomas et al., 2000). *GintAMT2* contains all residues that are required or predicted to be essential for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport, such as the aspartic acid D175, positioned at the outer pore of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> channel (Khademi et al., 2004), and the two histidine residues H183 and H332 within the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> channel (Javelle et al., 2006). Moreover, the *GintAMT2* protein contains the Ammonium Transporter Signature (ATS, Prosite entry PS01219) D-[FYWS]-[AS]-G-[GSC]-x(2)-[IV]-x(3)-[SAG](2)-x(2)-[SAG]-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFYWA](2)-x-[GK]-x-R, at positions 175-200 in transmembrane domain V (von Wirén and Merrick, 2004). However, a single amino acid substitution was found at position 196, where a K was present instead of the residues [LIVMFYWA] reported for other AMTs [Figure 10B].



▲ **Figure 10. (A)** Proposed topological model of *G. intraradices* AMT2 according to the prediction of the TMHMM algorithm. Putative transmembrane domains are labeled in white, residues corresponding to the ammonium transporter signature (ATS) are shown in black and residues that are required or predicted to be essential for ammonium transport activity are shown in white in a dark grey box. **(B)** Alignment of the ATS sequences. The boxed amino acid in the GintAMT2 sequence represents a residue that does not match the signature sequence. **(C)** Phylogenetic relationships between the deduced amino acid sequence of GintAMT2 (*G. intraradices*) and other fungal AMTs. Sequences were obtained from the GenBank database with the following accession numbers: *G. intraradices* (GintAMT1: CAI54276,



**Figure 10. (continued)** GintAMT2: CAX32490), *Hebeloma cylindrosporium* (HcAMT1: AAM21926, HcAMT2: AAK82416, HcAMT3: AAK82417), *Tuber borchii* (TbAMT1: AAL11032), *Ustilago maydis* (UmMEP1: AAL08424, UmMEP2: AAO42611), *Saccharomyces cerevisiae* (ScMEP1: P40260, ScMEP2: P41948, ScMEP3: P53390), *Schizosaccharomyces pombe* (SpAMT1: NP\_588424, SpAMT2: NP\_593462), *Aspergillus nidulans* (AnMEAA: AAL73117, AnMEPA: AAL73118), *Fusarium fujikuroi* (FfMEPA: CAJ44733, FfMEPB: CAJ44734, FbMEPC: CAK55531), *Cryptococcus neoformans* (CnAMT1: XP\_566614, CnAMT2: XP\_567361), *Synechocystis sp.* (NP\_442561 ).

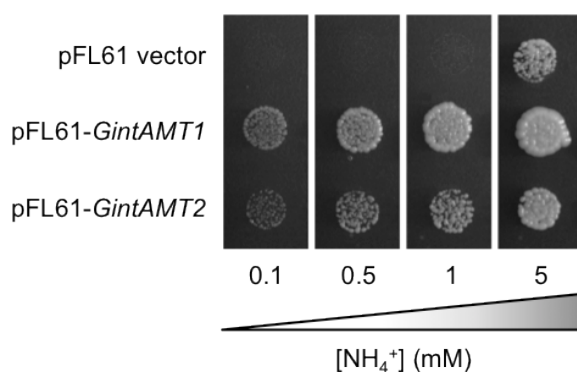
BLAST searches in the protein sequence database indicated that GintAMT2 shows the highest similarity to the functionally characterized AMTs of mycorrhizal fungi, such as GintAMT1 of *G. intraradices* (61% identity; López-Pedrosa et al., 2006), and HcAMT1 and TbAMT1 of the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma cylindrosporium* (60% identity; Javelle et al., 2001) and *Tuber borchii* (57% identity, Montanini et al., 2002), respectively. A phylogenetic analysis of GintAMT2 with a number of functionally characterized AMTs from other fungi showed that GintAMT2 clusters with the high-affinity NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in subgroup I [Figure 10C] (Javelle et al., 2003b).

To get further insights into the structure of the *GintAMT2* gene, the genomic clone was also isolated. The genomic sequence was 2985 bp long (GenBank Accession No. FR744743). Comparison between genomic and cDNA sequences showed that the transcription start site was located at position -206 (relative to ATG) and that *GintAMT2* contains three introns at positions 106, 315, 1227, with a size of 107, 86 and 77 bp, respectively. The first two introns are flanked by the characteristic splicing sequences GT and AG at the 5' and 3' ends, respectively. The 5' flanking region of *GintAMT2* (1381 bp upstream of the translation initiator ATG) was searched for putative regulatory elements present in the promoter sequences of the nitrogen-regulated genes of yeast and filamentous fungi (Wong et al., 2008). Two GATA core sequences acting as putative DNA binding domains of the GATA transcription factors, key regulators of N metabolism in all fungal species studies thus far, were found at positions -422 and -28 (relative to the translation start site). Additionally, the carbon-response elements CWGCC and CGGANA that in *Saccharomyces cerevisiae* recognize Gcr1p, a transcriptional activator of genes involved in glycolysis (Huie and Baker,

1996), and Rtg1 which plays a central role in the glucose-induced expression of hexose transporter genes (Özcan et al., 1996; Kim and Johnston, 2006), were found at the positions -985 and -927, respectively.

### 3.2. *GintAMT2* is a functional AMT

To investigate whether *GintAMT2* encodes a functional AMT, the open reading frame of the cDNA was expressed in the yeast triple *mep* mutant 31019b under the control of the constitutive yeast phosphoglycerate kinase gene promoter (Minet et al., 1992). This strain is defective in all three endogenous  $\text{NH}_4^+$  transporters (Mep1, Mep2 and Mep3) and is thus unable to grow on a medium containing  $<5$  mM  $\text{NH}_4^+$  as the sole N source (Marini et al., 1997). To compare *GintAMT2* with the already described *G. intraradices*  $\text{NH}_4^+$  transporter *GintAMT1* (López-Pedrosa et al., 2006), the coding sequence of *GintAMT1* was also expressed in the mutant yeast. As found for *GintAMT1*, *GintAMT2* was able to complement the growth defect of the mutant yeast strain to grow in the presence of 1 mM  $\text{NH}_4^+$  as the sole N source, indicating that *GintAMT2* encodes a functional  $\text{NH}_4^+$  transporter. However, *GintAMT1* restored more efficiently than *GintAMT2* the growth defect of triple *mep* $\Delta$  cells [Figure 11]. Since the *GintAMT2*-expressing yeast cells were unable to take up the  $\text{NH}_4^+$  analogue methylammonium, the kinetics of  $\text{NH}_4^+$  transport by *GintAMT2* could not be determined.



▲ **Figure 11.** Complementation of the  $\text{NH}_4^+$  uptake-deficient yeast strain 31019b ( $\Delta\Delta\Delta$  *mep1;2;3*) by *GintAMT1* and *GintAMT2*. Growth tests of yeast cells transformed with pFL61-*GintAMT1*, pFL61-*GintAMT2* or the empty vector pFL61 were performed on minimal medium containing different concentrations of  $\text{NH}_4^+$  as the sole N source.

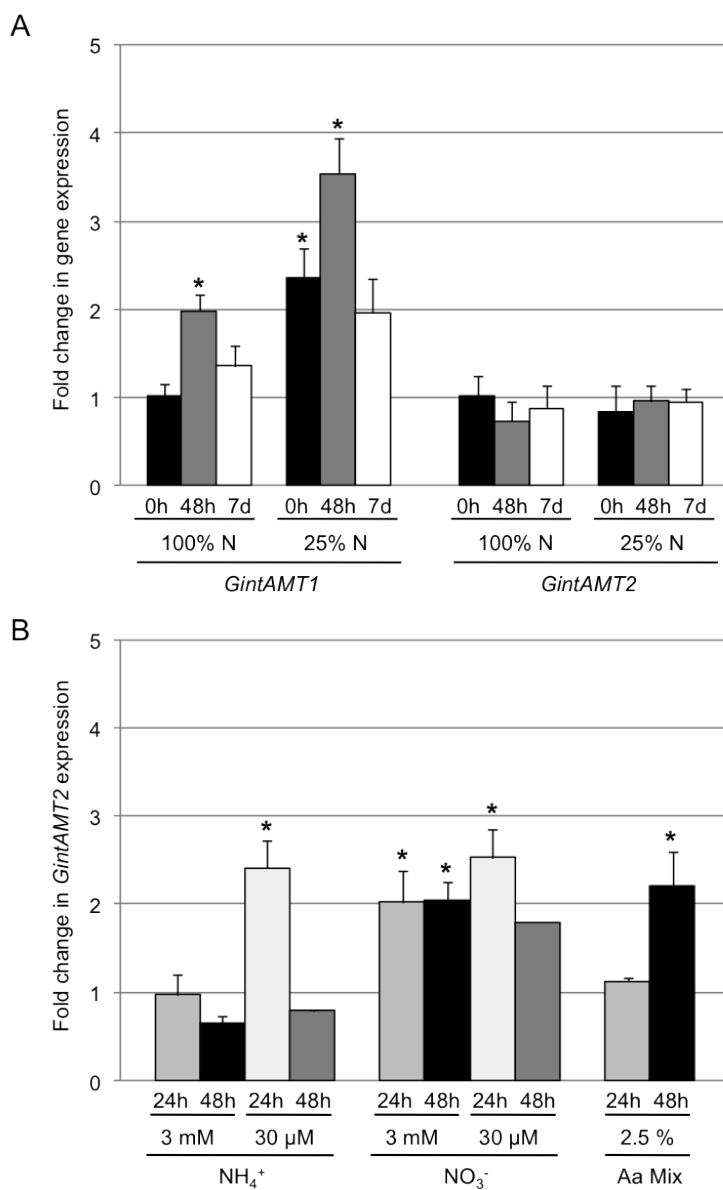
To assess if GintAMT2 complementation depended on external pH, growth tests were performed at initial pH values ranging from 4.5 to 7.5 on minimal medium containing 1 mM  $\text{NH}_4^+$  as the sole N source. Although yeast cells transformed with the empty vector showed better growth at high pH, growth complementation by either GintAMT1 or GintAMT2 was not affected by external pH (data not shown).

### 3.3. GintAMT2 response to nitrogen

To validate the *in silico* analysis of the *GintAMT2* promoter, that is, to determine whether *GintAMT2* gene expression is regulated by N, its expression was analyzed in the extraradical mycelium of *G. intraradices* developed in liquid M-C medium in the presence of either 3.2 or 0.8 mM  $\text{NO}_3^-$  and then exposed for different periods of time to a N-free medium. In contrast with what we observed for *GintAMT1*, whose transcript levels increased when the fungus was grown in a low-N M medium, *GintAMT2* expression levels were not affected by the N content of the culture media. While exposure of the mycelia grown either in standard- or low-nitrogen M-C media to a N-free medium induced a transient accumulation of *GintAMT1* transcript levels, those of *GintAMT2* were not affected [Figure 12A].

To further investigate the effect of N on *GintAMT2*, we also determined whether the addition of different N sources to the N-deprived mycelia had an effect on its expression. An accumulation of *GintAMT2* transcripts was observed 24 h after the addition of either 30  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$ . Addition of 3 mM  $\text{NH}_4^+$  did not affect *GintAMT2* expression at any of the two analyzed time-points, whereas *GintAMT2* was up-regulated 24 and 48 h upon exposure of the N-deprived mycelia to 3 mM  $\text{NO}_3^-$ . *GintAMT2* transcript levels also increased 48 h after supplementation of the N-free media with 2.5% of an amino acid mixture [Figure 12B].

► **Figure 12.** Effect of N availability on *G. intraradices* AMT gene expression. **(A)** Real-time RT-PCR analysis of *GintAMT1* and *GintAMT2* mRNA levels in the extraradical mycelium of *G. intraradices* developed in liquid M-C medium in the presence of either 3.2 mM (100% N) or 0.8 mM nitrate (25% N) and exposed for different periods of time to a N-free medium. **(B)** Effect of N addition to the N-starved mycelium on *GintAMT2* expression.



▲ **Figure 12 (continued)** Gene expression was analyzed by real-time RT-PCR in the extraradical mycelium developed in 25% N media, maintained for 48 h in a N-free media and exposed for 24 or 48 h to 3 mM or 30 μM of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or an amino acid mixture (2.5%). Control plates were supplemented with H<sub>2</sub>O. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1α. Relative expression levels were calculated by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method using as reference sample the control mycelia grown in complete M-C media for the N starvation experiment (A) and the N-starved mycelium and supplemented with H<sub>2</sub>O for the N re-supply experiments (B). Error bars represent SE of the mean of three independent experiments. \*: statistically significant (*p*<0.05) in comparison to the respective control value.

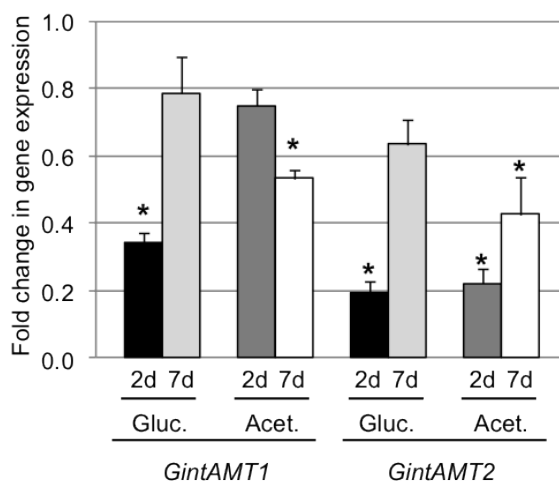
### 3.4. Effect of different carbon sources on gene expression

Our *in silico* analysis of the *GintAMT2* promoter suggested that this gene might be regulated by C. To investigate if transcription of the *G. intraradices* NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters was affected by a C supply, *GintAMT1* and *GintAMT2* expression were assessed in the extraradical mycelia that had been either supplemented with glucose in the root compartment of a split-petri dish or with acetate, a C source taken up and assimilated by the extraradical mycelia (Pfeffer et al., 1999), in the hyphal compartment. Gene expression analyses were performed 2 and 7 days after C supplementation. When glucose was added to the root compartment, *GintAMT1* and *GintAMT2* expression were transiently down-regulated. However, a different gene expression pattern was observed when the *G. intraradices* extraradical mycelia had been directly exposed to acetate. While *GintAMT2* expression was down-regulated at the two time-points analyzed, *GintAMT1* was just slightly reduced 7 days after the addition of acetate [Figure 13].

### 3.5. GintAMT2 is up-regulated during the intraradical symbiotic phase

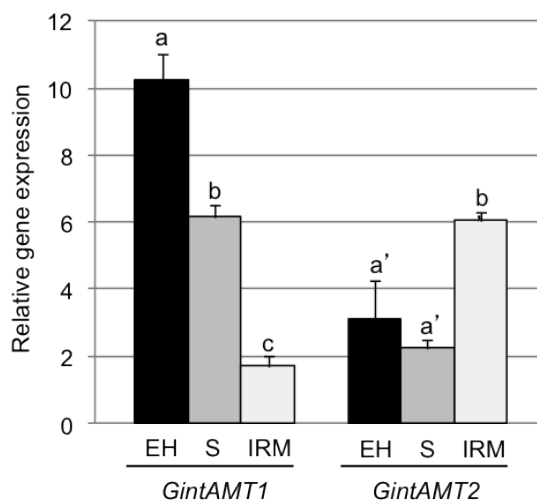
As a step toward understanding the role of *GintAMT1* and *GintAMT2* in *G. intraradices*, we also investigated whether *GintAMT1* and *GintAMT2* were differentially expressed during the fungal life cycle. This was initially done by analyzing *GintAMT1* and *GintAMT2* expression on RNA from extraradical hyphae developed in the hyphal compartment of the split-petri dishes, on RNA from the *G. intraradices*-colonized carrot roots lacking extraradical mycelia and on RNA isolated from quiescent spores. Mycorrhizal colonization of the carrot roots was 8-10%. Specific amplification of fungal material with the primers designed to amplify *GintAMT1* and *GintAMT2* was confirmed by performing conventional PCR reactions on *G. intraradices* and carrot genomic DNAs and on cDNAs from *G. intraradices* extraradical mycelia and from carrot and *Medicago* non-mycorrhizal roots (data not shown). Transcript levels of *GintAMT1* and *GintAMT2* accumulated differentially in the different fungal structures. In the symbiotic intraradical phase, that is, the mycorrhizal roots lacking extraradical mycelium, the expression levels of *GintAMT2* were higher than

those of *GintAMT1*; however, *GintAMT1* was more highly expressed than *GintAMT2* in the extraradical hyphae and in the spores [Figure 14].



▲ **Figure 13.** Time-course analysis of *GintAMT1* and *GintAMT2* expression in the extraradical mycelium of *G. intraradices* grown in liquid M-C medium in the HC compartment of a split-Petri dish after the addition of 25 mM glucose (Gluc.) to the RC or 4 mM acetate (Acet.) to the HC. Control plates were prepared by adding an equal volume of H<sub>2</sub>O to either compartment. Gene expression was analyzed by real-time RT-PCR. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using as reference sample the extraradical mycelium developed in the HC of control split-Petri dishes. Error bars represent SE of the mean of three independent experiments. \*: statistically significant ( $p < 0.05$ ) in comparison to the respective control value.

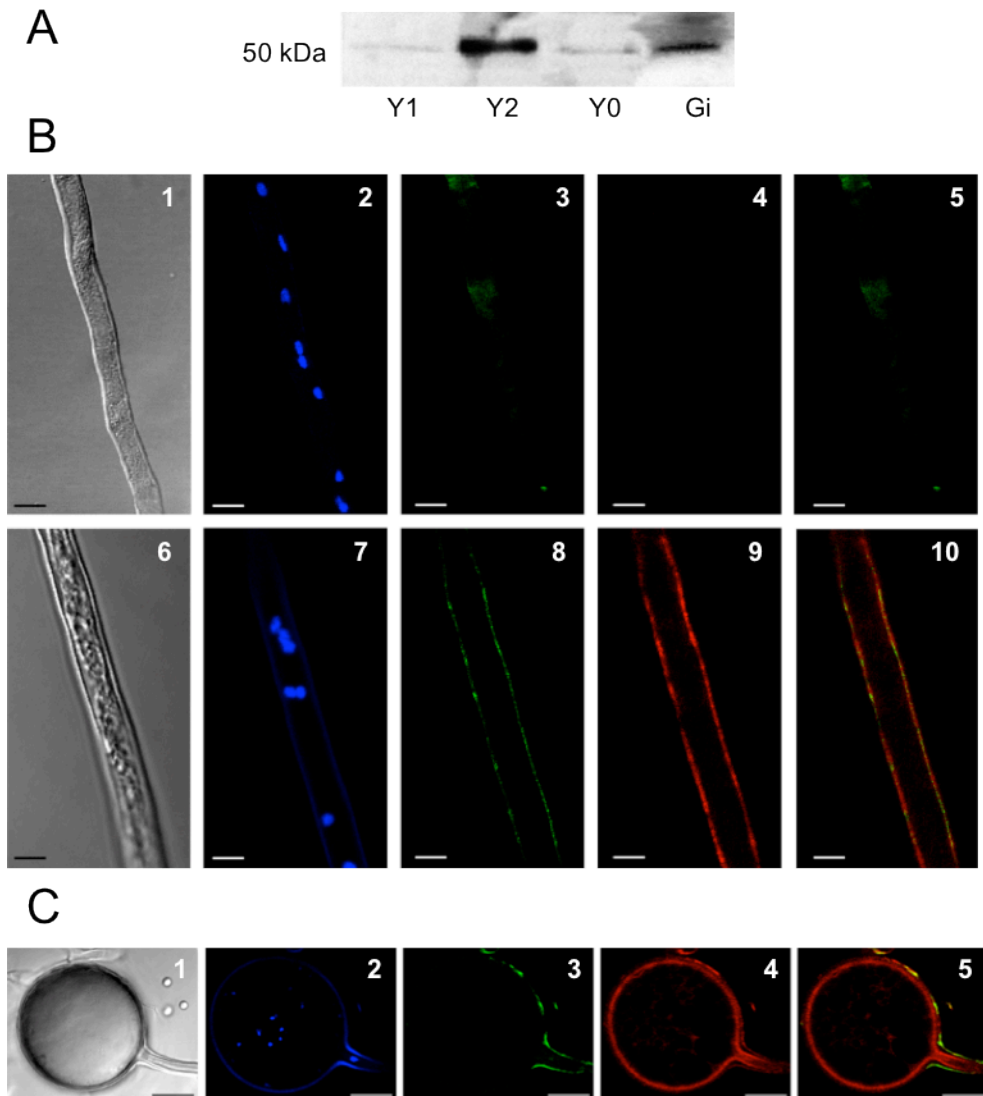
► **Figure 14.** *GintAMT1* and *GintAMT2* expression in the different fungal structures. Real-time RT-PCR analysis of *GintAMT1* and *GintAMT2* mRNA in extraradical hyphae (EH), quiescent spores (S) and intraradical mycelium (IRM) in monoxenically grown carrot mycorrhizal roots. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the elongation factor 1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the  $2^{-CT}$  method.



### 3.6. Immunolocalization of GintAMT2

Having established that *GintAMT2* was more highly expressed in the intraradical fungal structures, we decided to investigate the location of the encoded protein by using polyclonal antibodies raised against a peptide corresponding to the 6 to 21 amino acids at the N-terminus of *GintAMT2*. Affinity-purified antibodies cross-reacted with the peptide, whereas the preimmune serum showed no cross-reaction (data not shown). Although our *in silico* analyses revealed that the amino acid stretch selected to raise the antibodies against *GintAMT2* was absent in the coding sequence of the other AMTs found in the *G. intraradices* transcriptome (Tisserant et al., 2012), specificity of the affinity-purified antibodies for *GintAMT2* was checked by protein gel blot analysis of microsomal membrane fractions isolated from the 31019b yeast cells expressing the available sequences of *GintAMT1* (López-Pedrosa et al., 2006) or *GintAMT2*, and from *G. intraradices* extraradical mycelia. A protein with an apparent molecular mass of 50 kDa was detected in the microsomal fractions of *G. intraradices* and of the *GintAMT2*-expressing yeast cells. However, no protein signal was detected in the microsomal fraction isolated from the *GintAMT1*-expressing cells, the yeast cells transformed with the empty vector [Figure 15A] and in the blots incubated with the preimmune serum (data not shown).

With the specificity of the antibody confirmed we performed immunofluorescence detection of *GintAMT2* in the extraradical mycelia of *G. intraradices* and in mycorrhizal carrot roots. The *GintAMT2* antibody was detected with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 568 (red signal) and the sections were counterstained with a wheat germ agglutinin (WGA)-Alexa Fluor 488 conjugate to localize chitin and to expose the fungus as a green fluorescent signal and with DAPI to reveal the nuclei. The red fluorescence pattern obtained by confocal microscopy of the immunostained extraradical fungal structures indicated a plasma membrane location of *GintAMT2* in the extraradical hyphae [Figure 15B.9] and in the spores [Figure 15C.4]. Controls with the antibodies pre-blocked with the synthetic peptide showed no labeling [Figure 15B.4]. Unfortunately, cross-reactivity of the antibodies with the plant proteins hampered detection of the *GintAMT2* protein in the intraradical fungal structures (data not shown).

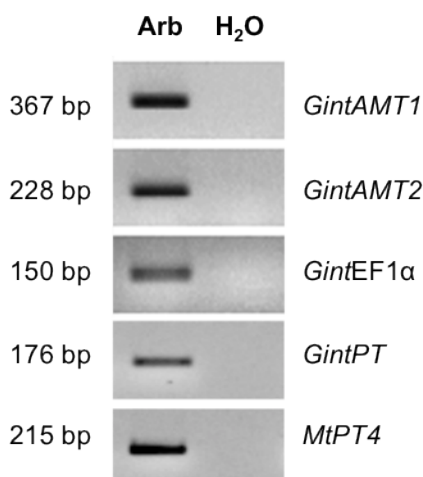


▲**Figure 15.** Immunolocalization of GintAMT2. (A) Western blot analysis of GintAMT2 in the microsomal fraction isolated from the 31019b ( $\Delta\Delta\Delta$  mep1;2;3) yeast cells transformed with pFL61-*GintAMT1* (Y1), pFL61-*GintAMT2* (Y2) or the empty vector pFL61 (Y0) and from a microsomal fraction isolated from *G. intraradices* (Gi). Localization of the GintAMT2 protein in the extraradical mycelium (B) and spores (C) of *G. intraradices*. The images represent optical sections of 1  $\mu$ m. Nomarski views of a hypha (B1 and B5) and a spore (C1) are shown. The specificity of the antibody was tested by pre-incubating the antibody with the epitope peptide (B4). Antibodies to GintAMT2 were detected by indirect immunofluorescence with secondary antibodies (red; B3, B9 and C4). Nuclear DNA was stained with DAPI (blue; B2, B7 and C2) and fungal wall was stained with WGA (green; B3, B8 and C3). Overlaps of the WGA with the anti-GintAMT2 immunofluorescence images are shown (B5, B10 and C5). Scale bars = 15  $\mu$ m (B) and 25  $\mu$ m (C).



3.7. *GintAMT1 and GintAMT2 are expressed in arbuscules*

Given the importance of the arbuscule-cortical cellular interface in nutrient exchange and to get further insights into the potential role of the *G. intraradices* AMTs in the symbiosis, RT-PCR experiments were performed in RNA from laser microdissected (LMD) cortical cells containing arbuscules. Approximately 2000 *M. truncatula* cortical root cells containing arbuscules were collected and two independent biological samples were considered. As a positive control for the presence of the fungus, expression of *GintEF1 $\alpha$*  was monitored [Figure 16]. LMD samples were validated by analyzing expression of the mycorrhiza-specific plant phosphate-transporter *MtPT4* (Harrison et al., 2002) and of the fungal phosphate transporter *GintPT*, which can be considered positive controls for arbusculated cells. RT-PCR assays showed that both *GintAMT1* and *GintAMT2* were expressed in arbuscules, suggesting that both transporters are active in the arbuscular interface.



◀**Figure 16.** Gel electrophoresis of RT-PCR products obtained from RNAs isolated from LMD arbuscule-colonized cortical cells (Arb.) using specific primers for *GintAMT1* and *GintAMT2*. *GintEF1 $\alpha$* , *GintPT* and *MtPT4* amplicons, obtained from parallel control reactions, were used as internal standards.

## 4. Discussion

Fungi frequently encode multiple AMT proteins. Of the sequenced fungal genomes, for example, *S. cerevisiae* contains three homologs (Marini et al., 1994, 1997), *Hebeloma cylindrosporum* has three (Javelle et al., 2001, 2003a), *Laccaria bicolor* has eight (Lucic et al., 2008), and *Ustilago maydis* has two

(Smith et al., 2003). The main function of the fungal AMTs is to act as  $\text{NH}_4^+$  permeases to import  $\text{NH}_4^+$  either to obtain N as a nutrient source or to retrieve  $\text{NH}_4^+$  that has leaked out during metabolism (Marini et al., 1997). However, some fungal AMTs have evolved a regulatory function. Examples include MEP2 of *S. cerevisiae* (Lorenz and Heitman, 1998), SpAMT1 of *Schizosaccharomyces pombe* (Mitsuzawa 2006) and UmMEP2 of *U. maydis* (Smith et al., 2003), which are required for the induction of filamentous growth under low-nitrogen conditions. Therefore, fully characterization of individual AMT homologs of a fungal species is needed to understand the specific contribution of each AMT to the adaptation of the fungus to particular growth conditions and/or to overall  $\text{NH}_4^+$  uptake.

In this study, the cloning and characterization of the *G. intraradices* gene *GintAMT2*, a second member of the AMT family of this AM fungal species, is reported. The encoded protein shares a high level of sequence identity to other AMTs of the AMT/MEP family and is able to complement a *S. cerevisiae* *mep1mep2mep3* triple mutant. *GintAMT2*-mediated  $\text{NH}_4^+$  uptake into the yeast cells presumed a localization of the corresponding protein in the plasma membrane, which was further confirmed with anti-*GintAMT2* specific polyclonal antibodies. In *G. intraradices*, *GintAMT2* was indeed shown to be located in the plasma membrane. As it has been reported for the *A. nidulans* ammonium permease MepC (Monahan et al., 2006), no methylammonium transport attributable to *GintAMT2* activity was detected under the conditions tested. Although the kinetic properties of *GintAMT2* could not be determined, its close phylogenetic relationship with the high affinity AMTs of other fungi suggests that it might encode a high-affinity and low capacity AMT. Despite the high sequence identity between *GintAMT1* and *GintAMT2*, the improved growth of the *GintAMT1*-expressing yeast cells compared with the *GintAMT2*-expressing cells and the finding that *GintAMT2* does not transport methylammonium suggest that these two AMTs are functionally different.

Differential accumulation of *GintAMT1* and *GintAMT2* transcripts in the different fungal structures also suggests that their encoded proteins might play different physiological roles in the symbiosis. The higher expression

levels of *GintAMT1* in the extraradical mycelium suggests a preferential role for its gene product in fungal N acquisition from the soil, while increased expression of *GintAMT2* in the intraradical fungal structures suggests a preferential role in the symbiotic association. However, detection of *GintAMT1* and *GintAMT2* transcripts in the LMD arbuscule–colonized cortical cells indicates that both transporters might have overlapping physiological functions in the symbiotic interface. Given that current experimental evidence supports a role for AMT proteins in  $\text{NH}_4^+$  uptake (Khademi et al., 2004; Lamoureux et al., 2010) and that  $\text{NH}_4^+$  is the N form taken up by the plant at the arbuscular interface (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010), expression of AMT genes in the arbuscules indicates that there might exist a competition between the plant and the fungus for the nitrogen that is present in the interfacial apoplast (Guether et al., 2009a). Since our gene expression analyses on LMD cells are not quantitative, the relative contribution of each individual transporter in the arbuscules remains to be determined. Expression of *GintAMT2* in the intercellular hyphae the fungus develops inside the root could also account for the higher expression level of this gene in the symbiotic intraradical phase. Unfortunately, cross-reactivity of the GintAMT2 antibodies with the plant proteins precluded determining the precise intraradical fungal structures where the protein is located.

Detection of the GintAMT2 protein in the fungal structures the fungus develops outside the root, that is, hyphae and spores, and accumulation of *GintAMT1* and *GintAMT2* transcripts not only in the extraradical hyphae, the fungal structures involved in nutrient uptake from the soil, but also in arbuscules and spores suggests a role for these AMTs in processes other than N uptake for nutrition. Interestingly, some fungal AMTs (Mep2 in *S. cerevisiae*, UmMEP2 in *U. maydis*, CaAMT2 in *C. albicans*, SpAMT1 in *S. pombe* and MepB in *Fusarium fujikuroi*) haven been shown to be required for a switch from single-cell growth to filamentous growth in response to N limitation and a role for these transporters as nitrogen-sensors has been proposed (Lorenz and Heitman, 1998; Smith et al., 2003; Biswas and Morschhauser, 2005; Mitsuzawa, 2006; Teichert et al., 2008). In the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, it has been recently reported that

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> accumulation has a direct effect on germ-tube differentiation, fungal appressorium formation and differentiation responses that affect pathogenicity (Miyara et al., 2010). These authors have hypothesized that modulation of processes regulating NH<sub>4</sub><sup>+</sup> accumulation, as found in host plants (Pageau et al., 2006), may contribute to the rapid colonization of the host and the transition from biotrophic-quiescent to active necrotrophic infections. Unfortunately, the lack of mutant screening and stable transformation systems for AM fungi (Harrier and Millan, 2001; Helber and Requena, 2008) hampers functional characterization of the individual AMT proteins. However, it is tempting to speculate that the spore and arbuscule AMTs might play a role in intracellular NH<sub>4</sub><sup>+</sup> retention leading to regulation of fungal development.

Differential transcript accumulation of *GintAMT1* and *GintAMT2* in response to N availability supports previous findings suggesting that the AMT genes are differentially regulated within a particular fungal species. In the *G. intraradices* extraradical mycelium, *GintAMT1* was induced under low N conditions while *GintAMT2* was constitutively expressed. This expression pattern is similar to that of the *Aspergillus nidulans* genes encoding the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeases MeaA and MepA and of the *Cryptococcus neoformans* AMT1 and AMT2 genes, with MeaA and AMT1 being constitutively expressed and MepA and AMT2 induced by N limitation (Monahan et al., 2002; Rutherford et al., 2008). In *S. cerevisiae* and some filamentous fungi, such as *A. nidulans*, *N. crassa* and *Fusarium fujikuroi*, expression of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeases is regulated by the GATA transcription factors, a family of transcription factors that activate gene expression when levels of preferred N sources become limiting (Marzluf 1997). This regulatory system is known as N metabolite repression in filamentous fungi (Wiame et al., 1985) or N catabolite repression in *S. cerevisiae* (Cooper et al., 1983). The identification of two GATA core sequences in the promoter sequences of *GintAMT2* and the observation that *GintAMT1* presents an expression profile typical of genes subjected to N metabolite repression suggests that these mechanisms might also operate in AM fungi and supports the view that the N regulatory mechanisms may be conserved within fungi. Although in the absence of knock out mutants it is difficult to define the precise physiological role of the different *G. intraradices*

AMTs, by analogy with what happens in other fungal species, induction of the high-affinity AMT GintAMT1 in response to N limitation suggests that it probably acts to scavenge  $\text{NH}_4^+$ . However, constitutive expression of GintAMT2 in N-limiting conditions and transitory induction after the addition to the N-starved mycelia of different N sources suggests a role for this transporter in retaining the  $\text{NH}_4^+$  derived from the metabolism of different nitrogen sources, as it has been shown for the *A. nidulans* MeaA permease (Monahan et al., 2006).

Transient induction of *GintAMT2* mRNA levels in response to low concentrations of  $\text{NH}_4^+$  is in agreement with previous data using a similar model system showing transient induction of the enzymatic activity of key enzymes of the anabolic arm of the urea cycle (Cruz et al., 2007). The lack of response to high  $\text{NH}_4^+$  concentrations supports our hypothesis that GintAMT2 is a high-affinity transporter and suggests that under these conditions  $\text{NH}_4^+$  uptake might be mediated by an as yet uncharacterized low affinity transporter. Because all endogenous or exogenous nitrogen sources are eventually converted to  $\text{NH}_4^+$  and/or amino acids and since it has been proven that the addition of a high nitrate concentration to the extraradical mycelium up-regulates a nitrate transporter and several nitrogen metabolizing enzymes at shorter times than used in this study (Tian et al., 2010), induction of *GintAMT2* expression 24 h after the addition of nitrate could occur through changes in the  $\text{NH}_4^+$  or amino acid intracellular levels. This hypothesis is supported by our finding that the addition of low  $\text{NH}_4^+$  concentrations or an amino acid pool induced *GintAMT2* expression. In this sense, it was found that the intracellular level of glutamine regulates AMT gene expression in *H. cylindrosporum* (Javelle et al., 2003a).

In addition to the regulation by nitrogen, *GintAMT1* and *GintAMT2* were regulated in response to carbon. A C supply would have been expected to increase the amount of C skeletons available for the synthesis of amino acids and, therefore, the fungal N demand and uptake. However, *GintAMT1* and *GintAMT2* expression was down-regulated after the addition of either glucose to the root compartment or acetate to the HC of the split Petri. Further experiments, such as determining the intracellular  $\text{NH}_4^+$  and amino

acids concentrations or the existence of carbon-dependent mechanisms of gene regulation in AM fungi, are needed to elucidate the underlying regulatory mechanisms.

In conclusion, data presented in this work show that the *G. intraradices* AMT family is comprised of at least two members. While GintAMT1 appears to act mainly as an  $\text{NH}_4^+$  scavenger under N limiting conditions, GintAMT2 seems to play a role in  $\text{NH}_4^+$  retention. Our gene expression data also suggest that, like in other fungal species, the *G. intraradices* AMT proteins play a role not only in N uptake for fungal nutrition but also to retrieve  $\text{NH}_4^+$  that has leaked out during metabolism. Development of a transformation system for AM fungi is needed to determine whether there is certain redundancy between the *G. intraradices* AMT genes, to define their precise physiological role and to determine whether they might also have a regulatory function.

#### Capítulo basado en:

Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2011) *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48:1044-1055





**NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation pathways in the arbuscular  
mycorrhizal fungus *Glomus intraradices***

VII







## 1. Introduction

In all biological systems the assimilation of N into macromolecules is essential for growth. N is a major element found in many of the simple compounds and nearly all the complex macromolecules of living cells. N can be obtained either from organic or inorganic sources, but ultimately it is converted into  $\text{NH}_4^+$  and glutamate.  $\text{NH}_4^+$ , nevertheless, is often the preferred source of N for microorganisms (ter Schure et al., 2000). Utilization of  $\text{NH}_4^+$  occurs exclusively via its incorporation into glutamate and glutamine, a process that can be achieved through two pathways. One involves the combined activity of glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2), which aminates glutamate into glutamine, and glutamate synthase (GOGAT) which transfer the amino group of glutamine to  $\alpha$ -ketoglutarate (or 2-oxoglutarate) to yield two molecules of glutamate. The alternative pathway involves the NADP-linked glutamate dehydrogenase (NADP-GDH; EC. 1.4.1.4), which catalyses the reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate to form glutamate.

The presence of two pathways for glutamate biosynthesis in several microorganisms has stimulated discussion on the need for two routes for the biosynthesis of the same end product. The roles of GDH and GOGAT have been studied in several fungi. In *Neurospora crassa*, it has been shown that the main function of GOGAT is the recycling of some organic N from glutamine to glutamate and that both GDH and GOGAT are involved in glutamate synthesis either under excess or limiting amounts of ammonium (Lomnitz et al. 1987). In *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Kluyveromyces*

*lactis*, evidence indicates that the GS-GOGAT is the major pathway for ammonium assimilation (Barel and MacDonald, 1993; Holmes et al., 1989; Valenzuela et al., 1995), while in *K. marxianus* the NADP-GDH is the primary pathway for glutamate biosynthesis (de Morais Jr. 2003). In *Saccharomyces cerevisiae*, when cells are grown with an excess of glucose as the source of carbon and energy and  $\text{NH}_4^+$  as the sole source of N, the rate of growth is determined by the ability of the cell to use GDH to assimilate  $\text{NH}_4^+$  and is not affected by mutations resulting in the loss of GOGAT. It can, however, be shown that the use of the NADH-linked GOGAT in place of the NADP-linked GDH results in a more efficient utilization of glucose.

In *S. cerevisiae*, one gene encoding GOGAT (Filetici et al., 1996) and two genes (GDH1 and GDH3) encoding NADP-GDH have been described (Avenidaño et al., 1997). Glutamate catabolism is achieved through a reaction catalyzed by a different but related enzyme, the GDH2-encoded NAD-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH) which determines glutamate degradation to  $\text{NH}_4^+$  and  $\alpha$ -ketoglutarate. During growth on  $\text{NH}_4^+$  and glucose, glutamate is formed by GDH1 or GDH3, so these isozymes act as N-anabolic enzymes (DeLuna et al., 2001; Magasanik, 2003). However, in the presence of glutamate as the sole nitrogen source or in the presence of ethanol GDH2 acts as a N-catabolic enzyme (Miller and Magasanik, 1990; Coschigano et al., 1991).

During the last years much progress has been made into the understanding of N metabolism in arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Current models of N transport in the AM symbiosis involve uptake of inorganic N from the soil and N assimilation via the anabolic arm of the urea cycle into arginine in the extraradical mycelium (ERM), arginine translocation (likely in connection with polyphosphates) to the intraradical mycelium (IRM), and breakdown of arginine via the catabolic arm of the urea cycle into inorganic N, which is subsequently transferred across the mycorrhizal interface to the host (Bago et al., 2001). This model has been supported by labeling experiments (Johansen et al., 1996; Jin et al., 2005) and enzymatic tests (Cruz et al., 2007) and has been further corroborated by molecular data (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010).

Participation of the GS/GOGAT pathway in primary  $\text{NH}_4^+$  assimilation has been demonstrated both in the ERM and IRM (Smith et al., 1985; Johansen et al., 1996; Breuninger et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005; Cruz et al., 2007; Tian et al., 2010). However, the role of GDH remains unknown in these fungi. The aim of the present study was to get further insights into the mechanisms of  $\text{NH}_4^+$  assimilation in AMF through the characterization of the genes encoding proteins putatively involved in the synthesis of glutamate. For this purpose, gene expression of GOGAT and GDH were determined under different environmental conditions and fungal structures.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Biological material and N treatments

ERM of *Glomus intraradices* DAOM 197198 (synonym of *Rhizophagus irregularis*; Krüger et al., 2012) was obtained in the bicompartmental system described previously (Chapter 3 and Pérez-Tienda et al., 2011). Briefly, the ERM was grown for 2 weeks in liquid M-C medium (15 ml) containing either 3.2 mM (standard-N) or 0.8 mM (low-N)  $\text{NO}_3^-$ . For the N starvation experiments, mycelia grown in low-N media was incubated during 2 and 7 days in a N-free media, and for the N-resupply experiments the 2 days N-deprived mycelium was exposed 24 and 48 h to 3 mM  $\text{NO}_3^-$ , 3 mM  $\text{NH}_4^+$  or 5 mM glutamine. Control plates were supplemented with  $\text{H}_2\text{O}$ . In all experiments, the samples were collected with forceps, rinsed with sterilized water, dried with sterilized filter paper, immediately frozen in liquid N and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

Mycorrhizal carrot roots were obtained by placing on top of a densely colonized hyphal compartment a sterile root fragment. Roots were incubated for 2 weeks at  $24^\circ\text{C}$  and extraradical hyphae attached to the roots were removed with forceps under a binocular microscope. Roots were then frozen in liquid N and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

*Medicago truncatula* seedlings were inoculated with *G. intraradices* using the Millipore sandwich method described by Guether et al., (2009a).

## 2.2. Arbuscule-colonized cortical cell collection by laser microdissection (LMD)

A Leica AS LMD system (Leica Microsystem, Inc) was used to collect arbuscule-colonized cortical cells from paraffin *M. truncatula* root sections as described before (Pérez-Tienda et al., 2011). Approximately 2.000 *M. truncatula* cortical root cells containing arbuscules were collected and two independent biological samples were considered.

## 2.3. Nucleic acids extraction and cDNA synthesis

For gene expression analyses, total RNA from the different tissues was extracted with the Plant RNeasy Kit (Qiagen), including the DNase treatment, and quantified spectrophotometrically using the Nanodrop 1000 device. cDNA was synthesized as previously described (Chapter 3 and Pérez-Tienda et al., 2011). Total RNA from arbusculated-cells was extracted following the Pico Pure kit (Arcturus Engineering) protocol. DNase treatment was performed using RNA-free DNase Set (Qiagen) in Pico Pure column, following the manufacturer's instructions. Total genomic DNA was extracted from *G. intraradices* ERM developed in a control plate using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

## 2.4. Blast searches

BLAST searches in the *G. intraradices* DAOM 197198 genome database (Glomus BD, <http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/GlomusGenome/>; Tisserant et al., 2012) were done using as query the amino acid sequences of *Saccharomyces cerevisiae* GDH1 (NP\_015020), GDH2 (NP\_010066) and GOGAT (NP\_010110).

## 2.5. Isolation of the GOGAT and GDH1 genes

The full-length cDNA sequences of GOGAT and GDH1 were obtained by RACE using the SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol from partial sequences obtained in the *G. intraradices* genome database (*step3\_c2884* for GOGAT and *remain\_c3471* for GDH1). The primers used for 3' and 5'RACE reactions are listed in Table 4 (Chapter 3).

## 2.6. Sequence analyses

Sequence analyses were performed using the DNASTar Lasergene software package (DNASTar, INC.), BLASTX algorithm available from the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul et al., 1997) and ClustalW2 algorithm available at EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>; Larkin et al., 2007). The protein family domains and functional domains were searched using the InterProScan available from EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>; Hunter et al., 2009). Genetic distances were estimated by using the Kimura's two-parameter method employed by MEGA5 (Tamura et al., 2011a).

## 2.7. Gene expression

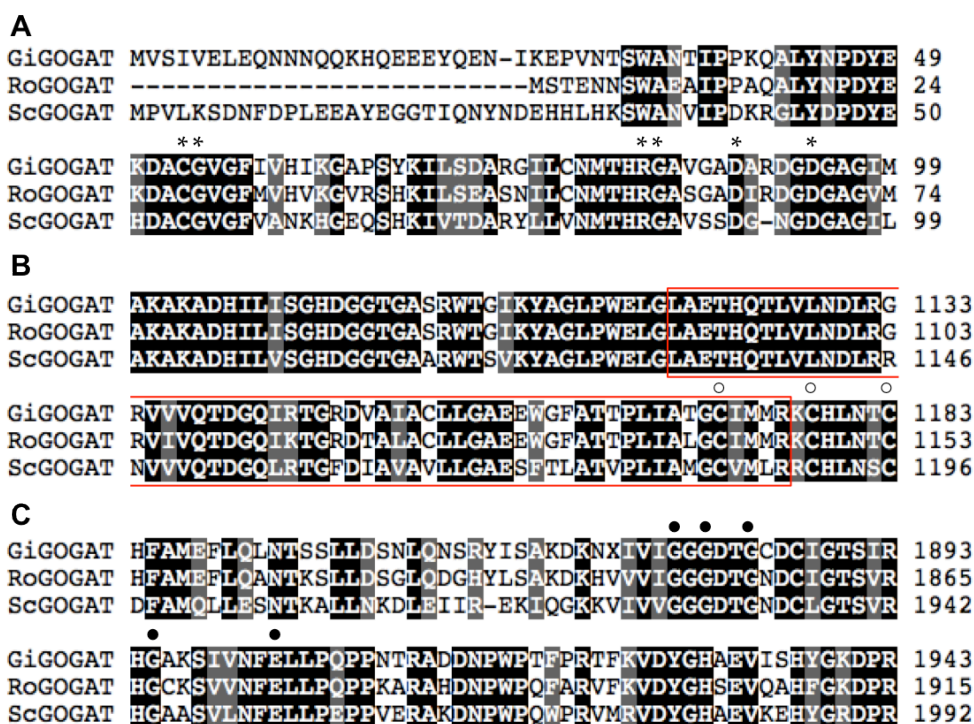
Transcript levels of genes were determined on an iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 2x on at least two independent biological samples from two replicate experiments according to Pérez-Tienda et al., (2011). The results obtained for the different treatments were standardized to the elongation factor 1-alpha (EF1 $\alpha$ ) gene levels (Benabdellah et al., 2009). Real Time RT-PCR reactions were carried out three times for each biological sample, with the threshold cycle (Ct) determined in duplicate. Only Ct values leading to a Ct mean with a standard deviation below 0.3 were considered. The relative levels of transcription were calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Schmittgen and Livak, 2008). Data were subjected to ANOVA and then to Fisher's protected least-significant difference (PLSD) test and were considered different at  $p < 0.05$  using SPSS. The primers used are listed in Table 4 (Chapter 3).

RT-PCR assays on the RNA isolated from the arbusculated cells were carried out using the One Step RT-PCR kit (Qiagen) according to Pérez-Tienda et al. (2011), using the GDH, GOGAT, EF1 $\alpha$  specific primers used for the real-time PCR assays and the specific primers for the mycorrhiza-specific plant phosphate transporter *MtPT4* (Zocco et al., 2011) and the fungal phosphate transporter *GintPT* (Table 4). The RT-PCR experiments were conducted on two independent biological replicates. The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis.

### 3. Results

#### 3.1. In silico sequence analyses

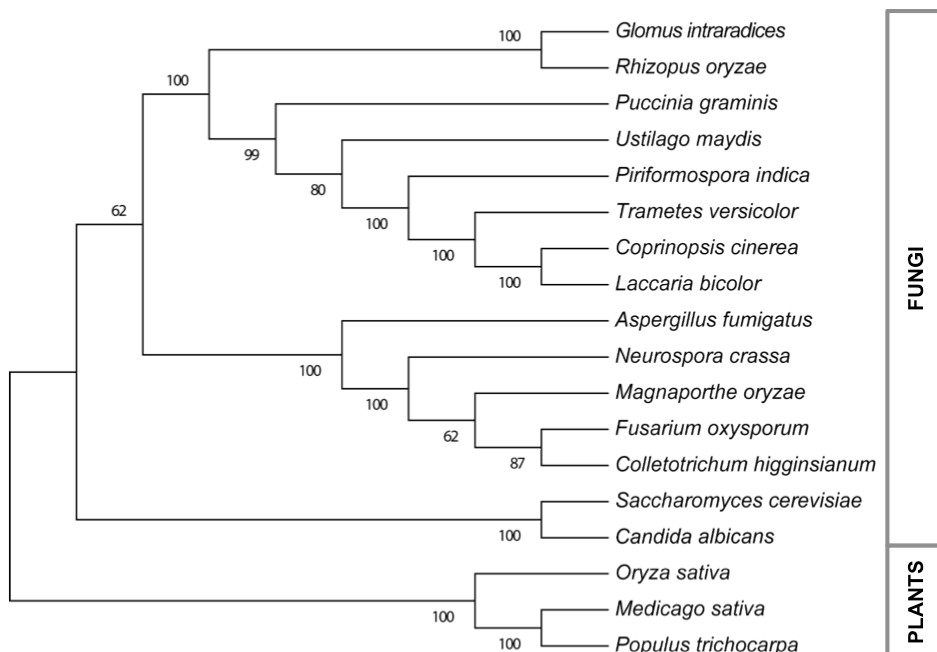
To identify genes involved in glutamate metabolism, BLAST searches were performed in the first drafts of the *G. intraradices* genome sequencing project using as queries the GOGAT, GDH1 and GDH2 amino acid sequences of *S. cerevisiae*. This search allowed us to identify two partial genes, one of 1686 bp encoding a GOGAT enzyme (*step3\_c2884*) and another one of 1146 bp (*remain\_c3471*) encoding a GDH. The full-length cDNAs of both genes were obtained by RACE, and named *GintGOGAT* and *GintGDH1*.



▲ **Figure 17.** Amino acid sequence alignment of fragments of *GintGOGAT* with GOGAT proteins from *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_010110) and *Rhizopus oryzae* (EIE76385). Identical amino acid residues are indicated by black box and similar amino acid residues by grey box. (A) The asterisks (\*) indicate conserved residues involved in glutamine binding of amidotransferases. (B) The region of FMN binding is indicated with red box and the opened circles (o) indicate three cysteines putatively involved in binding clusters a [3Fe-4S] cluster. (C) Five conserved residues that are important for NADH binding are indicated by closed circles (●).

*In silico* translation of the full-length *GintGOGAT* cDNA revealed an open reading frame encoding a 2.098 amino acid polypeptide with a predicted molecular weight of 232 kDa. Comparison with the amino acid sequence databases showed that it presents the highest degree of homology to the NADH-GOGAT of *Rhizopus oryzae* (Mucoromycotina) and *Puccinia graminis* (Basidiomycota), with 74% and 72% identity, respectively. *GintGOGAT* contains all features characteristic of NADH-GOGAT proteins, such as all the N-terminal glutamine amidotransferase (GATase) type 2 domain (Prosite entry PS51278); the flavin mononucleotide (FMN) binding domain that contains a cysteine cluster (CX<sub>5</sub>CX<sub>4</sub>C) which three cysteine residues (C1172, C1178 and C1183) putatively involved in binding a [3Fe-4S] cluster; and the NADH binding site at the C-terminus [Figure 17].

Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of fungal NADH-GOGAT shows that *GintGOGAT* is more closely related to the Basidiomycota than to Ascomycota GOGAT amino acid sequences [Figure 18].



▲ **Figure 18.** Phylogenetic relationships between the deduced amino acid sequence of *GintGOGAT* (*G. intraradices*) and other fungal NADH-GOGATs. Sequences were obtained from the GenBank database with the following accession numbers: (**cont.**)



**Figure 18. (continued)** *Rhizopus oryzae* (EIE76385); *Puccinia graminis* (EFP88939); *Ustilago maydis* (XP\_759997); *Piriformospora indica* (CCA67497); *Trametes versicolor* (EIW60065); *Coprinopsis cinerea* (XP\_002911893); *Laccaria bicolor* (XP\_001878616); *Aspergillus fumigatus* (XP\_750485); *Neurospora crassa* (XP\_957167); *Magnaporthe oryzae* (XP\_003715392); *Fusarium oxysporum* (EGU83336); *Colletotrichum higginsianum* (CCF33590); *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_010110); *Candida albicans* (EEQ42543); *Populus trichocarpa* (XP\_002332732); *Medicago sativa* (AAB41904); *Oryza sativa* (BAA35120).

The full-length *GintGDH1* cDNA contains 1551 nucleotide-long open reading frame with 47 nucleotides before the putative ATG start codon and a tail of 62 bp. The translation product of this open reading frame was 511 amino acids long, with a predicted molecular weight of 56 kDa. The predicted sequence from cDNA shows the *GintGDH1* shows the highest similarity to the GDHs of *R. oryzae* and *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota), 66 and 63% identity, respectively. The predicted *GintGDH1* amino acid sequence exhibited characteristics of the ELFV dehydrogenase superfamily, with the glycine-rich region [LIV]-x(2)-G-G-[SAG]-K-x-[GV]-x(3)-[DNST]-[PL] (Prosite entry PS00074) at positions 145-158 containing a conserved lysine (K) residue at position 151 [Figure 19].

A phylogenetic analysis of *GintGDH1* with other representative fungal GDHs show the separation of NAD- and NADP-dependent GDHs sequences in two well differentiated clusters. GDH1 protein of *G. intraradices* was grouped into the NADP-GDH cluster [Figure 20]. Thus, *GintGDH1* can putatively be classified as a new member of NADP-GDH type and is the first one identified in an AM fungus.

► **Figure 19.** Alignment of the amino acid sequence of the GDH1 gene of *G. intraradices* with those of other fungal species: *Saccharomyces cerevisiae* (ScGDH1, P07262); *Rhizopus oryzae* (RoGDH1, EIE80124); *Hebeloma cylindrosporium* (HcGDH1, AAL06075); *Tuber borchii* (TbGDH1, AAG28788). Identical amino acid residues are indicated by black box and similar amino acid residues by grey box. The ELFV sequence, which is highly conserved among amino acid dehydrogenases, is indicated with a red box.

```

ScGDH1 -----MS---EPEFQQAYEEVVSLEDSTLF 23
TbGDH1 -----MSNLAPEPEFQQAYNELVHSLRDQNS- 26
HcGDH1 -----MVKP-FEPEFQQALDELTTSL--QPFL 24
GiGDH1 MLSLSFFSNMASKTRVAKIIFKRSQPYFCPVINGRSYSTAITSGDNEPSFLDSVQIYF 60
RoGDH1 -----MNSSQVFPFRPLVKKSILLSSSRFLT-----TAATQAACNSDEPSFLQSVENYY 48

ScGDH1 EQHPEYR---KVIPIVSVPERITQFRVTWENDKGEQEVAAQGYRVQYNSAKGPYKGGRLRF 79
TbGDH1 SRLPQIL---RLCLSSPPERVLQFRVTWEDDKGNFQVNRGYRVQFNSALGPYKGGRLRF 82
HcGDH1 DANPQYK---KALEIVQVPERVLQFRVWEDDQGVAVNHGFRVQYNSALGPYKGGRLRL 80
GiGDH1 NKAAKISGVSEKTLSHIKAPDCSLQVTFPIEVDDDKVEILGTGYRVHHSRHLPLVKGGIRF 120
RoGDH1 DHAASLSDVQPHLAHLRAVDSVLRVTFPIEVVNGKYEVIEGYRAQHSRHRPLVKGGIRF 108

ScGDH1 HPSVNLSDIKFLGFQEFKNSLTGLDMGGGKGGCLVDLKGSRNNEIRRICYAFMRELSR- 138
TbGDH1 HPTVNLSDIKFLGFQEFKNSLTGLNMGGGKGGSDDFPKGKSDNEIRRFCYSEMRLESK- 141
HcGDH1 HPSVNLSDIKFLGFQEFKNSLTGLSMGGGKGGSDDFPKGKSDSEIRRFCFSFMGELFR- 139
GiGDH1 SPGVNDEQVAAALALMTYKCAVVDVPPFGGAKGGISIDPKKFLAQLERITRRYTVELCQK 180
RoGDH1 SEEVDLQVEALASLMTYKCAVVDVPPFGGAKGGIKIDETKYAVEQLERITRRYTMELCQK 168

ScGDH1 -HIGQDTPVPAQDITGVGGREIYLFGAVRSYKN---SWEGLVTKGLNWWGSLIRPEATG 194
TbGDH1 -HIGQFTDVPACDITGVGGREIYLFGAVESYKN---QFEGVLTGKGITWGGSLIRPEATG 197
HcGDH1 -HIGSDTPVPAQDITGVGGREIYLFGAVKCLR---EFTGMLTKGGLTWGGSLIRPEATG 195
GiGDH1 AFIGPGVDVPAPDMGTGAREMAWIMDTFRQFHPNDVNSIGCVTKGPIISLGGVRRGRNEATG 240
RoGDH1 KFIGPGLDVPAPDVCTCPREMAWIMDTVAQFNVGDVNAAGCVTKGPIISLGGVRRGRNEATG 228

ScGDH1 YGLVYYTQAMIDY----ATNGKES-FEGKRVITISGSENVAYQYAAALKVIELGCTVVSISDS 249
TbGDH1 YGLVYYVAHMISY----ASGGKET-FAGKRVATISGSENVAYQYAAALKVLELGCKVITISDS 252
HcGDH1 YGLIVFVEHMIK----ACPEYSLDKPSTVAISGSENVAYQFTALKVIELGATVLSISDS 251
GiGDH1 LGVYYGVREFLSYPVVQKATGLSEKIEGKRVITIQGFEKVGYYAAKFFEKNGAKLIGIGEK 300
RoGDH1 LGVYYGIREFLGYREVQKKTGVSDKLENTTVLQGFENVGYHAAKFFEEGAKLVIGVGER 288

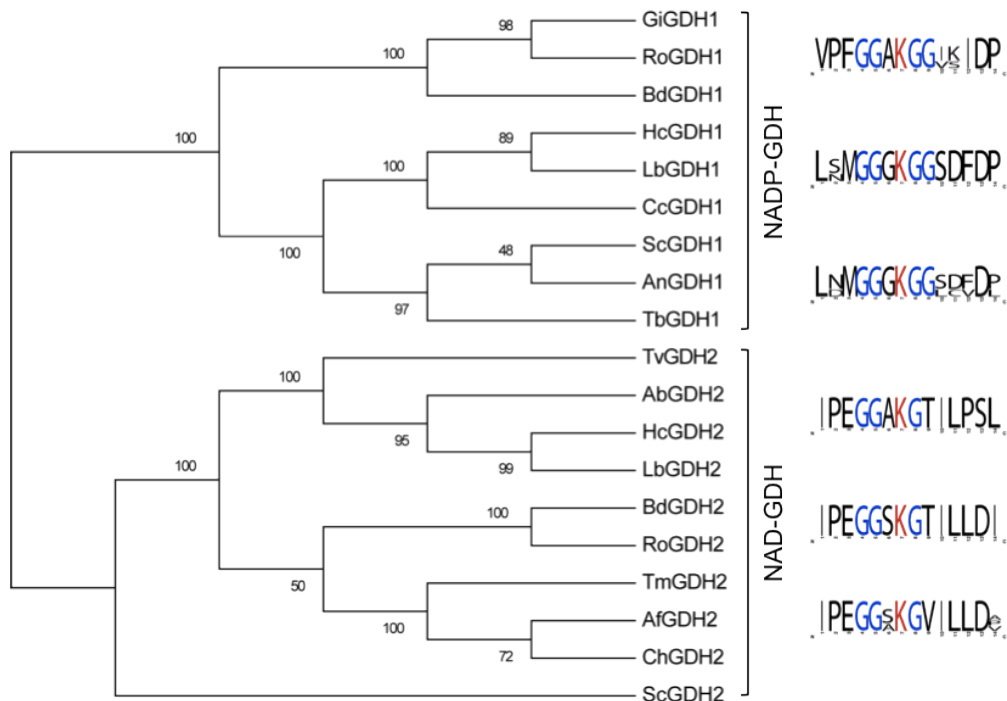
ScGDH1 KGCIIIS---ETGITSEQVADISSAKVNF--KSEQIVNEYSTFSENKVQYIACARP----W 301
TbGDH1 KGALIIATGEEGFNETDIELIAKCLKDR--GYLTQLHAAEDSFKS-RFKYLPCEP----W 305
HcGDH1 KGSIIIS--DKGYTKEFIRKVADLKLKG--GSLASLANEE-----GYTYHACARP----W 297
GiGDH1 DCGAYNPNGINIEDLFTYLVKAGTFQG-APNVDIIDDTLKILELDCDILIPALERQINL 359
RoGDH1 DCALYDRKGLNVENLYEYHRANKTFRGYSESQIIDQPSKILETECDILIPALERQIGL 348

ScGDH1 THVQKVDIATPCATONEVSGEEAKALVAQGVKFTAEGSNMGSTPEATAVFEATRSTATGP 361
TbGDH1 CHVDKVDIATPSATONEVSEQEAKELIASGCKFLAEGSNMGSTQEAINVVEEDRKSrk-- 363
HcGDH1 TLIPTHIATPGATONEVSAEBEALLKAGVRIVAEGSNMGCTADAIDIFESSRKAGP-- 355
GiGDH1 GNATKINAKIIGEAAANGPITPAANDIXIEKGIITLIDLLLNAGGVTVSYFEWLKNLXMR 419
RoGDH1 RNVSNIKAKIIGEAAANGPLTPAHEILEKAGKVITLIDLLLNAGGVTVSYFEWLKNLXMR 408

ScGDH1 SEAVWYGPpKAANLGGVAVSGLEMAQNSQRITWTSERVDQELKRIMINCFNECIDYAKKY 421
TbGDH1 ADGLWYGPpKAANCGVAVSGLEMAQNSQRLTWTSEQVDKELAGIMERCFWNCLNPAKEY 423
HcGDH1 -GGVWYAPGKASNCGVAVSGLEMAQNSQLAWTTQEVDSKLDMAECYIGICLTAETKW 414
GiGDH1 FGRMTKKWDELGKSKLVELVENNACXQLTESERKSIVQGAERDLYVYSGLEDTMVAACXE 479
RoGDH1 FGRMNKKWDERARSKVVALVEENACRPLTEAERKAVHGAEEDLYVYSGLEDTMIOACQE 468

ScGDH1 T--KDGK-VLPSLVKGANIASFIKVSDFMFDQGDVFE-- 454
TbGDH1 F--DIAEGELPSLVAGANIAGYKVVNAMKAQGDW-- 457
HcGDH1 SGEELTDEVLPSSLKGANVAGFIKVDAMKAQGDW-- 450
GiGDH1 TK--STAASKNIDFRTAAFVNAIQKIANVYEGSGIMEMT 516
RoGDH1 TR--QTAELKNVDYRTAAYINAIQKIAAVYEGSGMLFMH 505

```

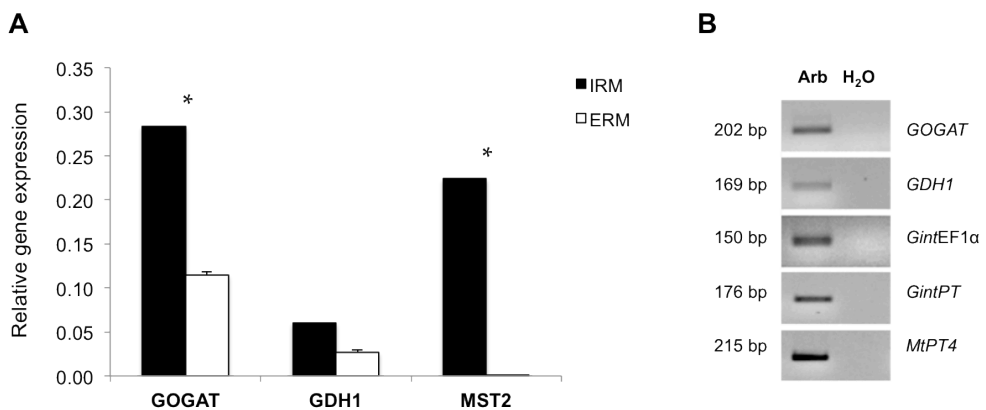


▲ **Figure 20.** Phylogenetic relationships between the deduced amino acid sequence of GintGDH1 (*G. intraradices*) and other fungal GDHs. Sequences were obtained from the GenBank database with the following accession numbers: *Rhizopus oryzae* (RoGDH1, EIE80124; RoGDH2, EIE80124); *Batrachochytrium dendrobatidis* (BdGDH1, EGF84115; BdGDH2, EGF84115); *Hebeloma cylindrosporum* (HcGDH1, AAL06075; HcGDH2, protein id\_477314); *Laccaria bicolor* (LbGDH1, AAA82936; LbGDH2, XP\_001876152); *Coprinopsis cinerea* (CcGDH1, XP\_001838930); *Tuber borchii* (TbGDH1, AAG28788); *Aspergillus nidulans* (AnGDH1, P18819); *Saccharomyces cerevisiae* (ScGDH1, NP\_015020; ScGDH2, NP\_010066); *Agaricus bisporus* (AbGDH2, CAB40797); *Trametes versicolor* (TvGDH2, EIW52377); *Aspergillus fumigatus* (AfGDH2, EDP54252); *Colletotrichum higginsianum* (ChGDH2, CCF32485); *Tuber melanosporum* (TmGDH2, XP\_002838967). The sequence logo with the typical pattern of the ELFV superfamily present in the different GDH clusters was generated using WEBLOGO (Crooks et al., 2004; <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

### 3.2. GOGAT and GDH1 expression in intra- and extraradical mycelia

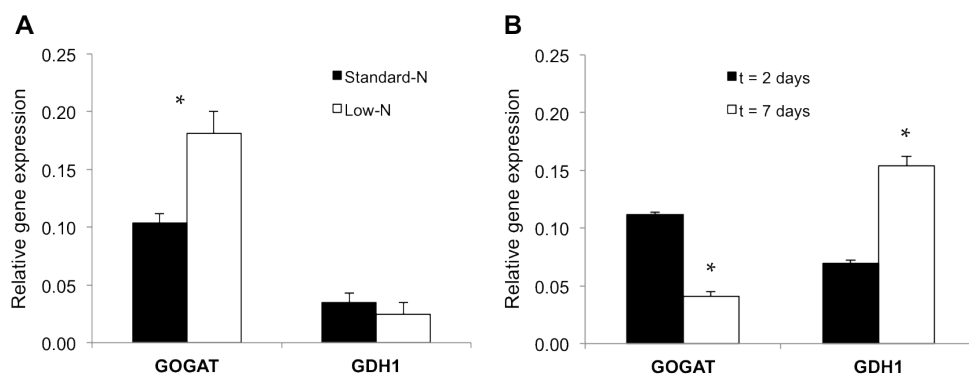
As a first step toward understanding the contribution of GOGAT and GDH1 in  $\text{NH}_4^+$  assimilation in *G. intraradices*, GOGAT and GDH1 gene expression were analysed on RNA isolated from extraradical hyphae developed in the hyphal compartment of the split-petri dishes and on RNA

from the *G. intraradices*-colonized carrot roots lacking extraradical mycelia. Mycorrhizal colonization of the carrot roots was 8-10%. Specific amplification of fungal material with the primers designed to amplify *GOGAT* and *GDH1* was confirmed by performing conventional PCR reactions on *G. intraradices* and carrot genomic DNAs and on cDNAs from *G. intraradices* ERM and from non-mycorrhizal carrot roots (data not shown). In these experiments the expression of the AM fungal monosaccharide transporter *MST2* that is highly expressed in the IRM has been included as a positive control (Helber et al., 2011). *GDH1* and *GOGAT* were more highly expressed in the IRM than in the ERM and in both symbiotic fungal structures *GOGAT* was more highly expressed than *GDH1* [Figure 21A]. It is noteworthy that in the *in planta* phase, transcript levels of *GOGAT* were higher than those of *MST2*, a high-affinity monosaccharide transporter that plays a major role in sugar uptake and that it is essential for the development of the symbiosis (Helber et al., 2011).



▲ **Figure 21.** *GOGAT* and *GDH1* expression in the different fungal structures. **(A)** Real time RT-PCR analysis of *GOGAT* and *GDH1* mRNA in ERM and IRM in monoxenically grown carrot mycorrhizal roots. *MST2* expression values were measured as a reference. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the  $2^{-CT}$  method. Asterisks stand for significant differences between IRM (black bars) and ERM (white bars) at  $p < 0.05$ . **(B)** Gel electrophoresis of RT-PCR products obtained from RNAs isolated from LMD arbuscule-colonized cortical cells (Arb) using specific primers for *GOGAT* and *GDH1*. *GintEF1 $\alpha$* , *GintPT* and *MtPT4* amplicons, obtained from parallel control reactions, were used as internal standards.

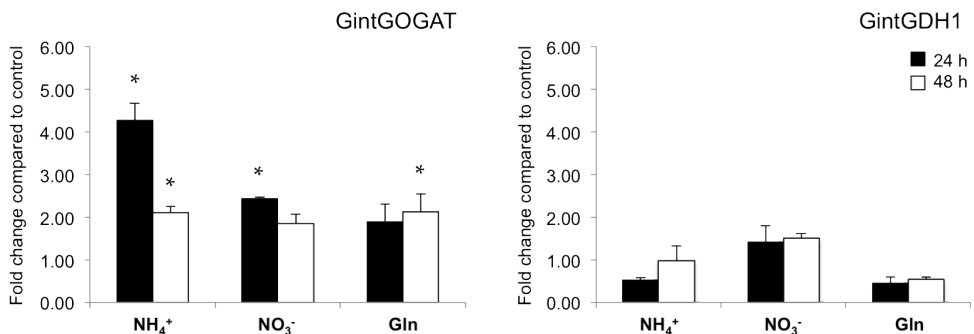
To get further insights about the expression of GOGAT and GDH1 during symbiosis, RT-PCR experiments were performed in RNA isolated from laser microdissected (LMD) *M. truncatula* cortical cells containing arbuscules. As a positive control for the presence of the fungus, we measured expression of *GintEF1 $\alpha$*  and of *GintPT*, a fungal phosphate transporter that has been shown to be expressed in arbuscules (Balestrini et al., 2007). LMD samples also were validated by analyzing expression of the mycorrhiza-specific plant phosphate-transporter *MtPT4* (Harrison et al., 2002), which is activated in arbuscule-containing cells and located at the periarbuscular membrane. RT-PCR assays showed that both *GOGAT* and *GDH1* were expressed in arbuscules, and, although these assays were not quantitative, GOGAT transcript levels seemed to be higher than those of GDH1 [Figure 21B]. These data clearly suggest a crucial role of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilating enzymes in the arbuscule.



▲ **Figure 22.** Effect of N availability on *GOGAT* and *GHD1* gene expression. **(A)** Real time RT-PCR analysis of *GOGAT* and *GDH1* mRNA levels in the ERM of *G. intraradices* developed in liquid M-C medium in the presence of either 3.2 mM (standard-N) or 0.8 mM nitrate (low-N). **(B)** Some plates grown in low-N conditions were exposed for different periods of time to a N-free medium. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the 2<sup>-CT</sup> method. Error bars represent SE of the mean of three independent experiments. Asterisks stand for significant differences ( $p < 0.05$ ) between the ERM developed in standard-N and low-N conditions (A) or between the ERM developed in standard-N conditions and N-starvation treatment (B).

### 3.3 Effect of N on GOGAT and GDH1 transcript levels

To investigate the effect of N availability on GOGAT and GDH1 transcript levels, qRT-PCR assays were performed in *G. intraradices* extraradical mycelium developed in liquid M-C medium (3.2 mM  $\text{NO}_3^-$ , standard-N) or in a M-C modified medium in which the N concentration was reduced to 0.8 mM (low-N). In contrast with what we observed for GOGAT, whose transcript levels increased significantly when the fungus was grown in a low-N medium (2.2 fold as compared to standard- or full-N), GDH1 expression levels were not affected by the N content of the culture media [Figure 22A]. To assess the effect of a N-starvation treatment on gene expression, media of the ERM developed in the low-N medium was replaced by a N-free medium and the fungus was allowed to grow for 2 and 7 d. Relative to the expression levels in the ERM grown in the full-N medium, GOGAT was down-regulated after 7 d of growth in a N-free medium while GDH was up-regulated [Figure 22B].

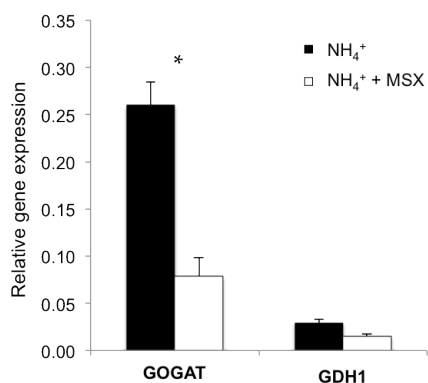


▲ **Figure 23.** Effect of N addition to the N-deprived mycelium on GOGAT and GDH1 expression. Gene expression was analyzed by real time RT-PCR in the ERM developed in N-low media, maintained 48 h in a N-free media and exposed for 24 (black bars) or 48 h (white bars) to 3 mM of  $\text{NH}_4^+$ , 3 mM  $\text{NO}_3^-$  or 5 mM glutamine (Gln). Control plates were supplemented with  $\text{H}_2\text{O}$ . Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method using as reference sample the N-deprived ERM supplemented with  $\text{H}_2\text{O}$ . Error bars represent SE of the mean of three independent experiments. \*: statistically significant ( $p < 0.05$ ) in comparison to the respective control value.

To further investigate the effect of N on GOGAT and GDH1 transcript levels, we also determined whether the addition of different N sources to the N-deprived ERM had an effect on their expression. Relative to the N-deprived ERM, an accumulation of GOGAT transcripts was observed after the addition of  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3^-$  or glutamine, although this effect was statistically significant only ( $p < 0.05$ ) 24 and 48 h after the addition of  $\text{NH}_4^+$ , 24 h after the addition of  $\text{NO}_3^-$  and 48 h after the addition of glutamine. *GDH1* gene expression did not significantly change upon the addition of either an inorganic or organic N source to the N-deprived ERM [Figure 23].

### 3.4. GOGAT and GDH1 response to MSX

We also tested the effect of the glutamine synthase inhibitor methionine sulphoximine (MSX) on *GOGAT* and *GDH1* gene expression. For this purpose, the N-deprived ERM was incubated for 24 h in the presence of 2.5 mM MSX in the  $\text{NH}_4^+$  re-supplementation media. Under these conditions,  $\text{NH}_4^+$  should accumulate and glutamine depleted in the ERM. Relative to the  $\text{NH}_4^+$  resupplied ERM, MSX down-regulated *GOGAT* gene expression (3.3-fold), whereas it had no effect on the *GDH1* transcript levels [Figure 24]. MSX neither had an effect on GS gene expression (data not shown), which is in agreement with previous observations that GS is not transcriptionally regulated by nitrogen (Breuninger et al., 2004).



◀ **Figure 24.** Effect of MSX on *GOGAT* and *GDH1* expression. Gene expression was analyzed by real time RT-PCR in the N-deprived mycelia and exposed for 24 h to 3 mM  $\text{NH}_4^+$  or 3 mM  $\text{NH}_4^+$  plus 2.5 mM MSX. Data were calibrated by the expression values obtained for the gene encoding the EF1 $\alpha$ . Relative expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method. Error bars represent SE of the mean of three independent experiments. Asterisks stand for significant differences between  $\text{NH}_4^+$  (black bars) and  $\text{NH}_4^+ + \text{MSX}$  (white bars) at  $p < 0.05$ .

#### 4. Discussion

Molecular studies performed so far on N metabolism in AM fungi have mainly focused on the expression analyses of genes involved in the primary assimilation of  $\text{NH}_4^+$  through the GS/GOGAT pathway and of genes encoding enzymes involved in arginine biosynthesis and breakdown in the ERM and IRM has been analyzed by different authors (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010; Fellbaum et al., 2012). However, in spite of the importance of glutamate, little attention has been paid to its biosynthetic pathways. Here, we report the identification and characterization of a *G. intraradices* gene putatively encoding a NADP-GDH and analyze regulation and contribution of the two glutamate biosynthetic (NADH-GOGAT and NADP-GDH) pathways in the ERM and IRM.

A partial gene putatively encoding a NADH-GOGAT was previously reported in *G. intraradices* (Tian et al., 2010). The full-length coding sequence of this partial clone, *GintGOGAT*, was isolated in this work. *In silico* analysis of the deduced amino acid sequence of *GintGOGAT* suggests that it encodes a NADH-GOGAT. A recent search in the completed genome sequence of *G. intraradices* indicates that in this fungus the NADH-GOGAT is encoded by a single gene.

*GintGDH1* putatively encodes a glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.x), an enzyme that catalyzes the reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate by  $\text{NH}_4^+$  in a reversible reaction utilizing either NADP or NAD as cofactors. GDHs have been studied in a wide range of organisms from bacteria to mammals including humans (Meti et al., 2011). The role of GDH in fungi is both catabolic and anabolic. It is generally accepted that NADP-GDH servers as an anabolic enzyme, whereas NAD-GDH is utilized for deamination of glutamate. Genetic information on GDHs in fungi is relatively limited. In *S. cerevisiae*, the anabolic and catabolic reactions are catalyzed by different isozymes. Two genes encode the *S. cerevisiae* NADP-GDH (GDH1 and GDH3), while the catabolic reaction is catalyzed by the NAD-GDH isozyme encoded by GDH2 (Miller and Magasanik, 1990). Although *S. cerevisiae* is the only fungus described so far for which NADP-



GDH activity is encoded by two genes, searches in the genome databases suggests that in other fungi, such as *R. oryzae* and the ectomycorrhizal fungi *L. bicolor* and *H. cylindrosporium*, the NADP- and NAD-GDHs are encoded by two different genes. A recent search in the completed genome sequence of *G. intraradices* allowed identification of a second GDH gene that is more closely related to NAD-GDHs (data not shown). The close phylogenetic relationship of *GintGDH1* with the NADP-GDHs of other fungi suggests that it might encode an anabolic enzyme that is involved in the synthesis of glutamate. However, biochemical characterization of its gene product is needed to confirm this hypothesis.

The highest transcript abundance of GOGAT compared to GDH1 in the IRM and ERM suggests that in both fungal structures GOGAT, in combination with the activity of the glutamine synthase, is the main route for  $\text{NH}_4^+$  assimilation. In the ERM, GOGAT was transcriptionally regulated by all the N treatments applied in this study (N availability, N starvation and N resupply to the N-deprived mycelium), while transcription of *GintGDH1* was only induced when the ERM after one week of N starvation.

Transcriptional regulation of GOGAT by N is in agreement with previous observations by Tian et al (2010). Up-regulation of *GintGOGAT* after re-supplying the N-starved mycelia with either  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  or glutamine concords with the increased glutamine synthase activity under these conditions (Breuninger et al., 2004), and suggests a role for this enzyme in glutamine metabolism under conditions of excess or  $\text{NH}_4^+$  in order to maintain the glutamate/glutamine ratio necessary for the distribution of amino acids and amides to other components of the cell. This hypothesis is supported by the observed down-regulation of GOGAT expression by the glutamine synthase inhibitor MSX, which would lead to an accumulation of glutamine.

*G. intraradices* GDH transcript levels increased when the mycelia grown with the lowest N supply was grown for one additional week in a N-free media. Induction of GDH transcription by N-starvation has been also observed in the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium* (Javelle et al.,

2003a), and in *L. bicolor* N starvation increased the GDH polypeptide levels (Lorillou et al., 1996). In the N-starved ERM of *G. intraradices*, the GDH1 transcripts were more abundant than those of GOGAT, suggesting that in these experimental conditions GDH1 is the main route for  $\text{NH}_4^+$  assimilation and glutamate biosynthesis. Our gene expression data suggest that in the presence of N the GS/GOGAT pathway is largely more active, while the GDH1 pathway was more active in the N-starved mycelium. This is in contrast with what would have been expected, with the GS/GOGAT more active when exogenous N concentrations are limiting and NADP-GDH under conditions of N excess, due to the higher affinity of glutamine synthase than NADP-GDH for  $\text{NH}_4^+$  (Harper et al., 2010). However, it should be kept in mind that this assumption has been made on the basis of the regulatory mechanisms in prokaryotes. In yeast, however, switch from one pathway to the other is determined by the affinity of GDH and GOGAT for  $\alpha$ -ketoglutarate rather than by the affinity of GS and GDH for  $\text{NH}_4^+$  (Magasanik, 2003). Determination of the kinetic parameters of the *G. intraradices* GS, GOGAT and GDH is needed to understand the regulatory mechanisms of the glutamate biosynthetic pathways in AM fungi.

Current models of N transport and assimilation in AMF assume that in the ERM  $\text{NH}_4^+$  is mainly assimilated through the activity of the GS/GOGAT pathway. These models were proposed on detailed labeling, metabolite, enzyme and transcript analyses in ERM grown in monoxenic cultures. However, given that the M media used in the monoxenic cultures has a high  $\text{NO}_3^-$  concentration (3.2 mM) and that in unfertilized soils concentrations of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  are low (approximately 20-50  $\mu\text{M}$ , Marschner 1995), our finding that in the N-starved mycelium  $\text{NH}_4^+$  is mainly assimilated through the GDH pathway open the question of which is the main assimilative  $\text{NH}_4^+$  pathway under natural conditions and if evidence from monoxenic cultures can be extrapolated to soil-grown plants.

Detection of GOGAT and GDH1 transcripts in the IRM, with the expression levels of GOGAT similar to those of the monosaccharide transporter MST2 highlights the importance of the N metabolism in the IRM and, more specifically, in the arbuscules. Development of these highly

branched fungal structures should be associated with significant changes in total protein composition, membrane dynamics and cell wall structure. Although the role of N metabolism, and more specifically of GOGAT, in arbuscule formation, turnover or function remains to be elucidated, it has been recently shown that N plays a role in the regulation of arbuscule lifespan in AM symbiosis (Javot et al., 2011).

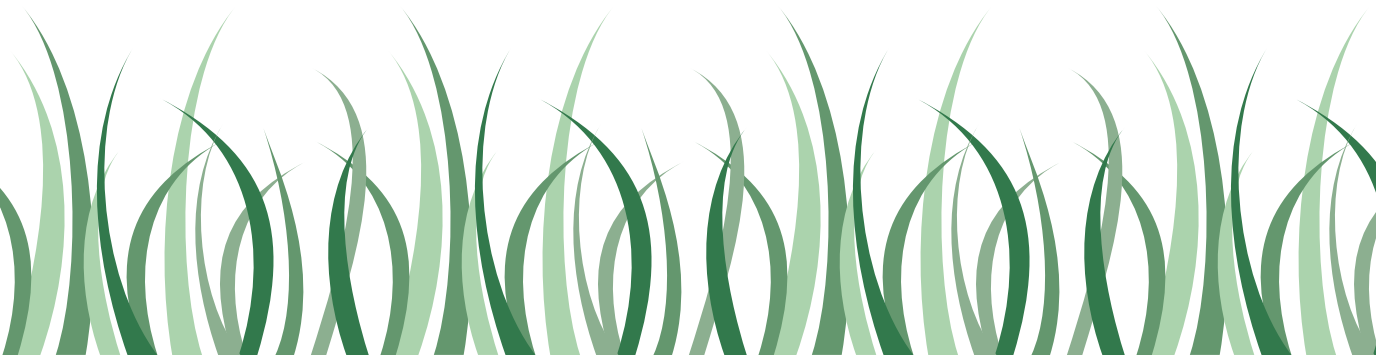
**Capítulo basado en:**

Pérez-Tienda J, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N.  $\text{NH}_4^+$  assimilation pathways in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (En preparación).



**Transcriptional regulation of host  $\text{NH}_4^+$  transporters  
and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots**

VIII





## 1. Introduction

Plants are completely dependent on N availability in the soil solution for their growth and productivity. In most soils,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  are the predominant sources of nitrogen (N) available for plant nutrition (Williams and Miller, 2001). Because the concentration of these two ions in the soil solution is generally low and fluctuant, N is often the major limiting macronutrient of plant growth, especially during the production of cereal crops (Mäder et al., 2002). Although plants can be supplied with N fertilizers, N is one of the most expensive nutrients to supply and commercial fertilizers represent the major cost in plant production. Furthermore, there is serious concern regarding N loss in the field, giving rise to soil and water pollution (Good et al., 2004).

Plants have evolved inorganic and organic N uptake systems to cope with the heterogeneous N availability in the soil. For nitrate (Crawford and Glass, 1998) and ammonium (Ludewig et al., 2007), two types of uptake system have been described: low-affinity transport systems (LATS), which operate at high nutrient concentrations ( $>1$  mM); and high-affinity transport systems (HATS) that predominate in the micromolar range (Wang et al., 1993). Modulation of HATS and LATS function in coordination with changes in the pattern of growth and development allows plants to cope with heterogeneous N availability in the soil (Robison 1994; López-Bucio et al., 2003; Zhang et al., 2007; Forde and Walch-Liu, 2009; Kraiser et al., 2011). In natural environments, plants also interact and associate with many and functionally diverse microorganisms that also contribute to an adequate N supply (Gage 2004; You et al., 2005). Nutritionally beneficial plant–bacteria

interactions (i.e. mutualistic symbiosis) can increase nutrient accessibility, uptake, or both (Bertrand et al., 2000; Park et al., 2009). The best known example of a beneficial plant–bacteria association for N nutrition occurs is the symbiotic association established between *Rhizobium* and legumes (Sprent and James, 2007). Besides bacteria, other microorganisms such as arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can modify root system architecture and increase the area of interaction with the soil contributing to better nutrient acquisition (Smith and Read, 2008).

Arbuscular mycorrhizal symbiosis are arguably the most common underground symbiosis, with around 80% of terrestrial plant species potentially able to associate with members of the fungal phylum Glomeromycota, in which AM fungi are now included (Schußler et al., 2001). Although not always symbiotic, the mutualistic nature of the association between plants and AM fungi is based largely on the exchange of nutrients, whereby the plant receives soil-derived mineral nutrients (P, N and trace elements such as Cu and Zn) from the fungus, while the fungus receives organic compounds from the plant (Smith and Read, 2008; Ferrol and Pérez-Tienda, 2009). The crosstalk with the AM fungus and the increased amount of available nutrients triggers a series of events in the plant, such as the activation of specific mycorrhizal nutrient uptake pathways or induction of already expressed transporters in the root to increase the exchange and reallocation of nutrients (Javot et al., 2007; Sawers et al., 2008; Smith and Smith, 2011; Smith et al., 2011).

Previous work has focused primarily on the transport of phosphorus. These studies showed that AM plants have two pathways that can contribute to phosphorus uptake from the soil: 1) direct uptake pathway from the rhizosphere by root epidermal cells (including root hairs, when present) and 2) the AM uptake pathway via the fungi. Non-mycorrhizal (NM) plants (non-colonized potential hosts of AM fungi or non-hosts) take up P only through the direct pathway, via Pi transporters expressed in the epidermis, but both pathways may operate in an AM plant. All AM plants investigated so far possess Pi transporters that are specifically or preferentially expressed in root cortical cells when these are colonized (for review see Bucher 2007; Barea et al., 2008).

As in the case of P, both pathways could act for the N uptake from the soil. However, the high mobility of N in the soil (especially  $\text{NO}_3^-$ ) has raised the question of whether AM fungi can contribute significantly to the N nutrition of the host (Smith and Smith, 2011). It has been suggested that an improved N status of AM plants may be simply a consequence of an improved P nutrition (Reynolds et al., 2005). Other studies, however, have demonstrated that AM fungi can deliver substantial amounts of N to the host plant, with an estimated 21 % of total N taken up by the fungal extraradical mycelium (ERM) in root organ cultures (Govindarajulu et al., 2005) and 75% of the total N in the leaves of *Zea mays* coming from the fungal ERM (Tanaka and Yano, 2005).

The ERM of AM fungi is able take up  $\text{NH}_4^+$  (Ames et al., 1983; George et al., 1992; Johansen et al., 1992, 1993, 1996; Frey and Schüepp, 1993),  $\text{NO}_3^-$  (Tobar et al., 1994, Johansen et al., 1996; Azcón et al., 2001) and organic N resources from the soil (Hawkins et al., 2000; Hodge et al., 2001). N is then translocated to the intraradical mycelium as arginine, and seemingly transferred to the plant in the form of  $\text{NH}_4^+$  (Govindarajulu et al., 2005; Jin et al., 2005; Cruz et al., 2007; Tian et al., 2010). Recently, plant  $\text{NH}_4^+$  transporters (AMTs) that are specifically expressed in arbuscule-colonized cortical root cells and that are likely involved in the transport of the mycorrhizal derived  $\text{NH}_4^+$  across the periarbuscular membrane have been identified in the legumes *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Glycine max* (Gomez et al. 2009; Guether et al. 2009b; Kobae et al. 2010b). It has been proposed that this mycorrhizal N-uptake pathway is similar in some ways to the well characterized mycorrhizal Pi uptake pathway. However, significant downstream effects of the N supplied by mycorrhizal fungi on plant N assimilation remain unknown.

To get further insights into the mycorrhizal N-uptake pathway, we aimed to identify in a non-legume plant the putative AMT gene(s) involved in  $\text{NH}_4^+$  uptake from the arbuscular interface and the possible role of plant GS/GOGAT pathway in the assimilation of the  $\text{NH}_4^+$  released by the AM fungus. To this end, we analyzed in the mycorrhizal association established



between *Oryza sativa* and *Glomus intraradices* the expression of the genes putatively encoding rice ammonium transporters (AMTs), glutamine synthase (GS) and AMTs and NADH-glutamate synthase (GOGAT).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant materials, growth conditions and inoculation methods

Rice seeds (*Oryza sativa* L. cv. niponbare) were surface sterilized with 70% ethanol for 1 min, sodium hypochlorite (30% v/v) for 30 min, washed repeatedly with sterile water (2-3 times), and incubated in sterile water for 10 min. Seeds were germinated in autoclaved vermiculite. Plantlets were transplanted to 300 ml pots when the first true leaf was expanded (two plantlets per pot). Pots contained a sterile mixture of soil:sand:vermiculite (1:2:6, v:v:v). Plants were grown in a phytochamber with 23/20 °C day/night temperature, 60% relative humidity and 16/8 h light/dark with a photosynthetically active radiation of 280  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Plants were watered with modified half-strength (0.5x) Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950), with 125  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , different N contents and supplemented with 90  $\mu\text{M}$  NaFeEDTA.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  losses, resulting from the reduction of  $\text{NO}_3^-$  salts, were compensated by the addition of the corresponding  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  salts, respectively. Mycorrhizal inoculation was performed as described by García-Rodríguez et al. (2007) using a sepiolite-vermiculite-based inoculum of the AM fungus *G. intraradices* DAOM 197198 (10%, v/v), containing spores, hyphae and fragments of mycorrhizal roots. Mock-inoculated control plants (or non-mycorrhizal plants) received the same proportion of the substrate of the inoculum and an aliquot of a filtrate (<20  $\mu\text{m}$ ) of AM inoculum to provide the microbial populations accompanying the mycorrhizal inoculum but free from AM propagules.

The treatments applied were as follows: non-mycorrhizal plants (NM plants) and inoculated with *G. intraradices* (AM plants) were watered with modified 0.5x Hoagland nutrient solution containing 7.5 mM (low-N) or 1.875 mM  $\text{NO}_3^-$  (standard or high-N). The pots were watered twice a week

during the second and third weeks after transplanting, and three times a week from the third week until the end of the experiment. Five replicates (5 pots, 10 plants) were set up for each treatment. After 8 weeks the plants were harvested, separated into shoots and roots, frozen quickly in liquid N and stored at -80 °C until used.

### *2.2. Analysis of mycorrhizal colonization and plant growth responses*

AM fungal colonization was estimated in an aliquot of the root system of each plant root samples after trypan blue staining (Phillips and Hayman, 1970) according to the grid-line intersect method (Giovannetti and Mosse, 1980) in combination with a stereomicroscope. The abundance or activity of the AM fungus in the roots was also estimated by using molecular markers, namely expression of the expression of AM fungal elongation factor 1 $\alpha$  (GintEF1 $\alpha$ ).

Shoot and root fresh weights of plants of all treatments were determined. Dry weights (DW) were determined after oven drying the plant tissues at 65 °C for 48 h. Plant responses to AM colonization were estimated by calculating the mycorrhizal growth response (MGR) using the equation of Hetrick et al. (1992):

$$\text{MGR} = 100 \cdot (\text{AM}-\text{NM})/\text{NM}$$

where AM and NM refer to biomass (dry weight) of AM and NM plants, respectively.

### *2.3. Elemental analyses*

Nutrient content of leaves was performed by the analytical service of the CEBAS-CSIC (Spain). Leaves were briefly rinsed with deionised water and oven-dried at 65 °C for 48 h, and ground to a fine powder. The samples were digested by a microwave technique, using a Milestone Ethos I microwave digestion instrument. A standard aliquot (0.1 g) of dry, finely ground plant

material was digested with concentrated nitric acid (HNO<sub>3</sub>) (8 ml) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2 ml). Subsequently, plant nitrogen and phosphorus content were analysed using a Flash 1112 series EA carbon/nitrogen analyser or ICP (Iris intrepid II XD2 Thermo), respectively.

#### 2.4. Identification of the rice AMT, GS and GOGAT sequences

The *Oryza sativa* genome database (<http://www.plantgdb.org/OsGDB/>) was searched for genes encoding AMT, GS and GOGAT by using BLAST and keyword searches. Sequences retrieved from the rice database were confirmed by BLAST searches in NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 2.5. Phylogenetic analysis of the rice AMT sequences

Protein alignment was constructed from the amino acid sequences of all the members of rice AMT gene family and other available model plant AMT sequences, using the ClustalW algorithm (Larkin et al., 2007). To estimate phylogenetic relationships, the alignment was analyzed using the Neighbour-Joining (NJ) method implemented in MEGA5 (Tamura et al., 2011a), with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, based on the Poisson model amino acid substitution (Nei 1987). In order to evaluate the number of replicate trees in which the associated taxa clustered together a bootstrap analysis (1000 replicates) was performed.

#### 2.6. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from whole roots of the different treatments using the phenol/SDS method followed by LiCl precipitation according to Manickavelu et al. (2007). For each treatment, roots from three independent biological samples (each one consisting of a pool of two root systems) were extracted. The first cDNA was synthesized from DNase-treated total RNA (1 µg) with 200 units of Super-Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and 50 pmol oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen), according to the manufacturer's

instructions. The resulting RT reaction product was used as template for PCR analysis.

### 2.7. Gene expression analysis

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) experiments were run on an iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Gene-specific primers were used to amplify the different AMTs, GS and GOGAT isoforms in the synthesized cDNAs (for gene-specific primer sequences, see Table 3). Because RNA extracted from mycorrhizal roots contains plant and fungal RNAs, the specificity of the primer pairs was also analyzed by PCR amplification of the *G. intraradices* genomic DNA. qRT-PCR reactions were carried out in a final volume of 20  $\mu$ l containing 10  $\mu$ l of iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 2x (Bio-Rad), 0.2  $\mu$ M of each gene-specific primers and 1  $\mu$ l of cDNA template. The PCR program consisted of an initial incubation at 95 °C for 3 min, followed by 38 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, where the fluorescence signal was measured, and an additional final cycle of dissociation curves to ensure a unique amplification. qRT-PCR determinations were performed on two independent biological samples with three technical replications and the threshold cycle (Ct) determined in triplicate. Only Ct values leading to a Ct mean with a standard deviation below 0.3 were considered. The Ct values obtained for each sample were normalized with *OsEF1 $\alpha$*  (Os03g08020) as internal control (Caldana et al., 2007). The relative levels of transcription were calculated by using the 2<sup>- $\Delta$ CT</sup> method (Schmittgen and Livak, 2008), and standard error was computed from the average of the  $\Delta$ CT values for each biological sample.

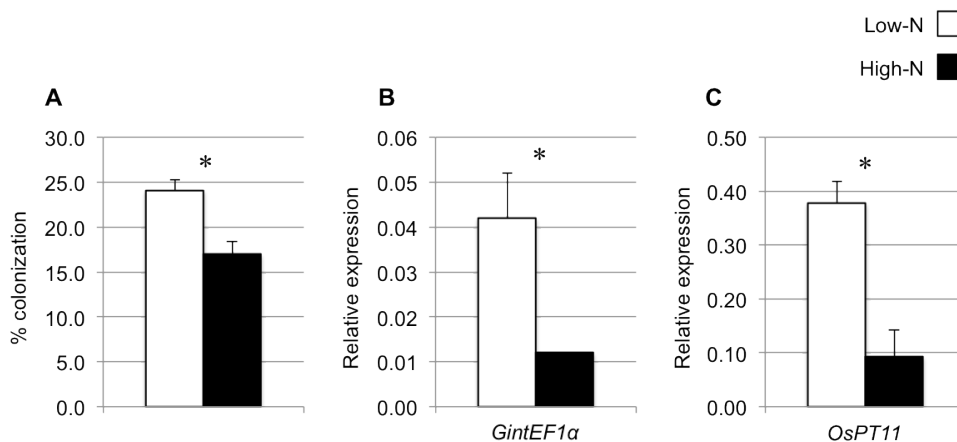
### 2.8. Statistical analysis

A one-way ANOVA, considering as independent variable the combination of the variables mycorrhization and N supply, followed by a Duncan or Fischer LSD test, was used to test for significant differences between treatments at each time, at  $p < 0.05$ . In all cases, preliminary analyses were performed to ensure no violation of the assumptions regarding each test.

### 3. Results

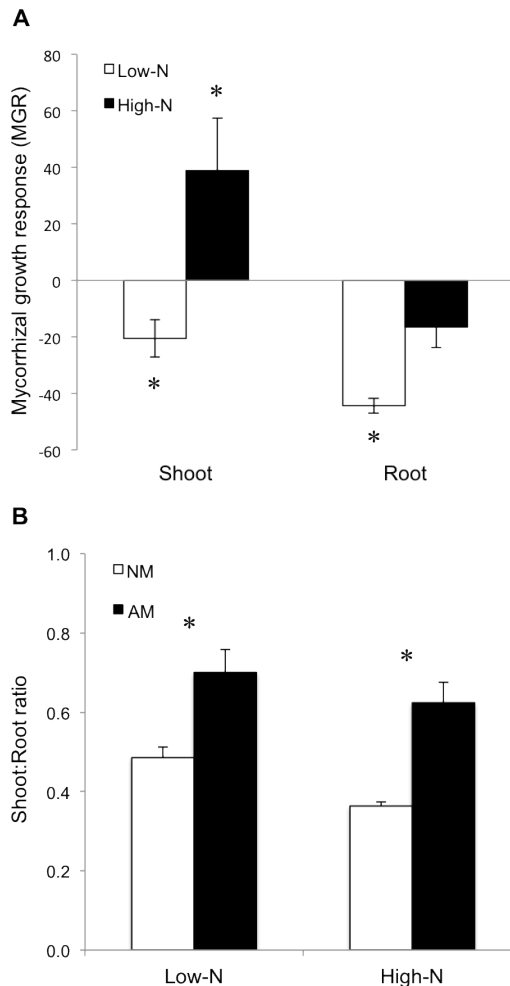
#### 3.1. AM colonization and plant growth

Eight weeks after transplanting, all characteristic fungal structures were present in colonized roots. Mycorrhization levels were significantly lower in plants fed with Hoagland solution (standard- or high-N) than in plants watered with a modified solution in which the N content was reduced to 25% (low-N) [Figure 25A]. This result was confirmed by analysing the expression of AM fungal elongation factor 1 $\alpha$  (*GintEF1 $\alpha$* ) gene by qRT-PCR in AM root samples [Figure 25B]. The level of expression of fungal *GintEF1 $\alpha$*  gene in plants grown with high-N was significantly lower than in the low-N plants, which correlates with the estimated colonization rates. In addition, as a reference for the symbiotic status of the roots, we also measured the gene expression of the mycorrhiza-specific plant phosphate transporter PT11 (Paszkowski et al., 2002; Glassop et al., 2007), which is considered to be one of the best indicators of a functional AM association in rice plants. Analysis expression of *OsPT11* gene showed that AM activity was higher in AM plants grown with low-N than with high-N [Figure 25C].



**▲Figure 25.** Quantification of arbuscular mycorrhizal colonization. **(A)** Colonization rates by standard line intersect methods ( $n = 5$ ) and qRT-PCR analysis of **(B)** *G. intraradices* elongation factor 1 $\alpha$  (*GintEF1 $\alpha$* ) ( $n = 3$ ) and **(C)** the mycorrhiza-specific plant phosphate transporter PT11 (*OsPT11*) ( $n = 3$ ). The relative expression of fungus *GintEF1 $\alpha$*  was calculated using  $2^{-\Delta CT}$  method with *OsEF1 $\alpha$*  as internal control. The relative expression of *OsPT11* was calculated using  $2^{-\Delta CT}$  method with *OsEF1 $\alpha$*  as housekeeping gene to normalize values. Asterisks stand for significant differences between low-N (white bars) and high-N (black bars) plants at  $p < 0.05$ .

The MGR of rice plants was dependent on N. A negative shoot and root MGR was observed when the plants were fertilized with a low-N nutrient solution, while a positive shoot MGR was observed in the high-N fertilized plants. These mycorrhizal growth responses represented a significant reduction of total plant biomass in the low-N plants and an increase of the shoot biomass in the high-N plants. However, at the two N doses the shoot/root ratio of the AM plants was higher than in the NM plants [Figure 26].



▲ **Figure 26.** Rice growth responses to mycorrhizal colonization. Shoot and root MGR (A) and shoot/root ratio of M and NM plants (B) fertilized with a high- or low-N nutrient solution. Mycorrhizal growth response (MGR) was calculated according to the equation of Hetrick et al. (1992). Values are averages  $\pm$  S.E. ( $n = 5$ ). Asterisks stand for significant differences between AM and NM plants within the same N treatment at  $p < 0.05$ .

### 3.2. Effect of the AM symbiosis on N, P and C leaf concentrations

Leaf P concentration was higher in AM than in NM plants independently of whether they were fertilized with the high- or the low-N nutrient solution. However, N concentration was only increased in the leaves of the N plants fed with the low-N solution. No significant differences were observed between the leaf C concentrations of the plants of the different treatments (Table 7).

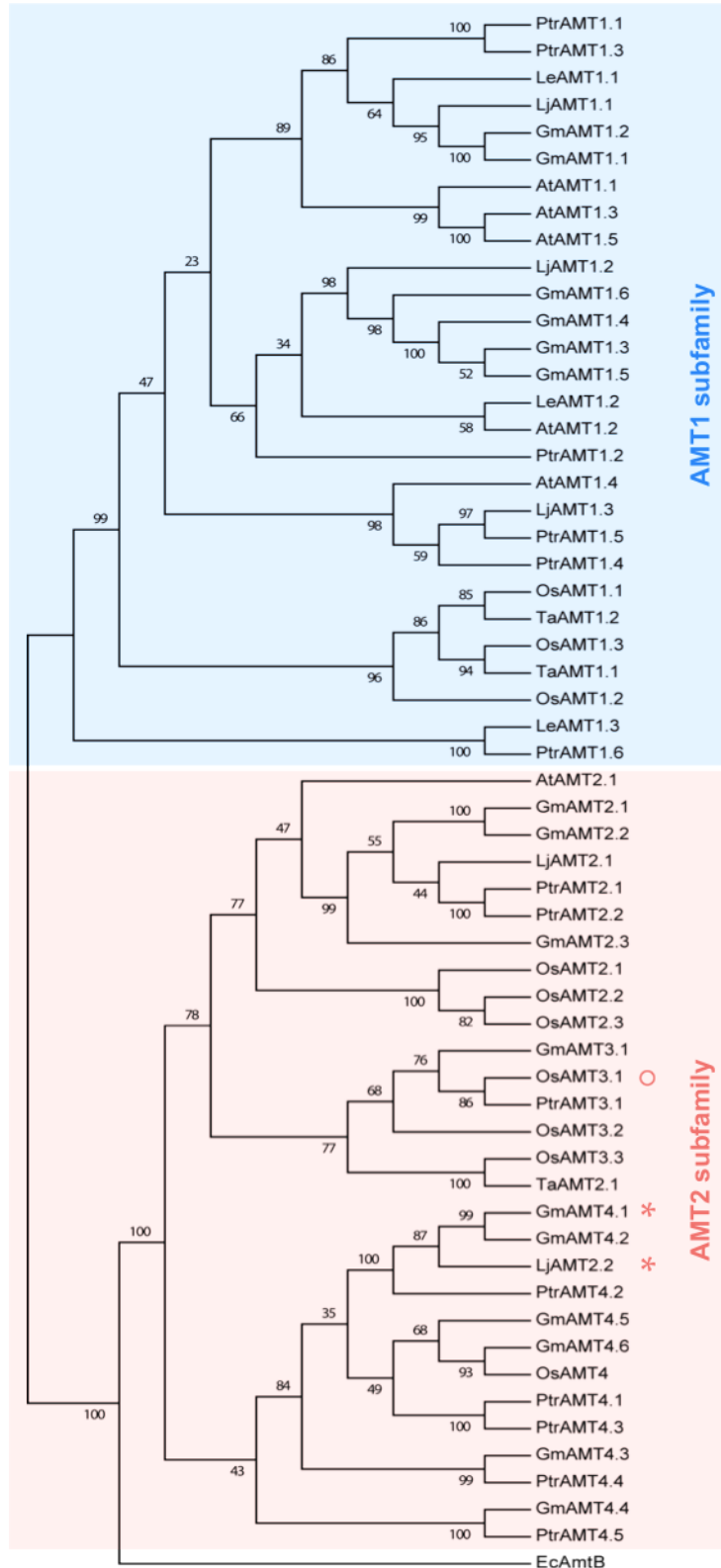
Treatment	P (mg per g DW)	N (mg per g DW)	C (mg per g DW)
<b>Low-N</b>			
NM	1.04 a	13.60 a	431 a
AM	2.06 c	19.37 b	428 a
<b>High-N</b>			
NM	0.92 a	24.59 c	422 a
AM	1.87 b	23.09 c	422 a

**Table 7.** P, N and C concentration of rice leaves of AM and NM plants grown at low- and high-N for 8 weeks. Values are averages  $\pm$  S.E. (n = 5). Values with the same letter in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### 3.3. The *Oryza sativa* AMT gene family

Ten putative *OsAMT* genes were identified in the rice genome database. Phylogenetic analysis based on the predicted amino acid sequences indicated that three *OsAMT* genes belong to the AMT1 subfamily and seven to the AMT2 subfamily of plant AMTs (Loqué and von Wirén, 2004) [Figure 27].

►**Figure 27.** An unrooted phylogenetic tree for the amino acid sequences of AMT1/AMT2 plant AMTs. The dendrogram was generated by MEGA5 using ClustalW for the alignment and NJ method for the construction for the phylogeny. Number next branches represent the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1.000 replicates). Mycorrhizal-specific AMTs are indicated by asterisk (\*). At, *Arabidopsis thaliana*; Ec, *Escherichia coli*; Gm, *Glycine max*; Lj, *Lotus japonicus*; Os, *Oryza sativa*; Ptr, *Populus trichocarpa*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Ta, *Triticum aestivum*.



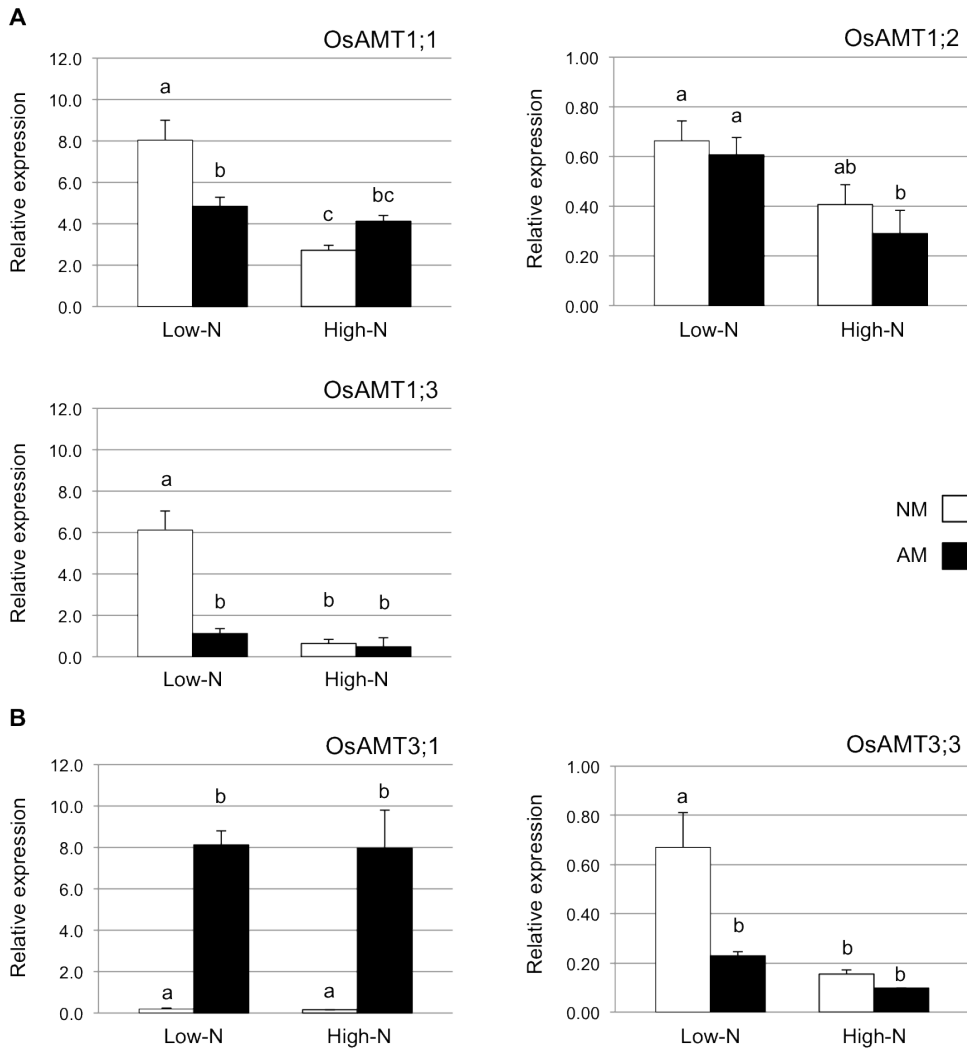


### 3.4. Expression profiles of AMT genes

Quantitative real-time RT-PCR was used to determine the abundance of putative OsAMT transcripts in total RNA from roots of NM and AM rice plants. Transcripts of the three AMT members of the AMT1 subfamily were detected in the roots of the plants of all treatments. Development of the symbiosis down-regulated *OsAMT1;1* and *OsAMT1;3* gene expression at low-N, but not at high-N conditions. In the roots of the NM plants, *OsAMT1;1* and *OsAMT1;3* gene expression decreased when plants were grown in N-limiting conditions. No significant differences were observed in the transcript levels of *OsAMT1;2*, the gene displaying the lower expression level, of the NM and AM roots of the plants grown at the two N regimes [Figure 28A]. Out of the seven members of the AMT2 subfamily, only *OsAMT3;1* and *OsAMT3;3* were detected in our experimental conditions [Figure 28B]. *OsAMT3;3* displayed the same expression pattern that *OsAMT1;1* and *OsAMT1;3*, that is down-regulation by N limitation and by the development of the symbiosis under N-limiting conditions. *OsAMT3;1* was highly expressed in the AM roots of both N treatments (38-52 fold induction compared to the NM plants), which suggests that *OsAMT3;1* is the rice orthologous of the *Lotus* and soybean mycorrhiza-specific  $\text{NH}_4^+$  transporters *LjAMT2.2* and *GmAMT4.1*, respectively.

### 3.5. Regulation of the GS/GOGAT pathway in AM roots

As a first step to investigate the role of the plant GS/GOGAT pathway in the primary assimilation of the  $\text{NH}_4^+$  released by the AM fungus, the rice genome database was searched for genes putatively encoding GS and GOGAT isozymes. This search allowed identifying four GS and GOGAT genes in rice. Three out of four GS genes encode cytosolic GS isoforms (*OsGS1;1*, *OsGS1;2* and *OsGS1;3*), while *OsGS2* encodes the chloroplastic GS isoform. *OsGOGAT1* and *OsGOGAT2* encode GOGAT isozymes that use NADH as electron donor (NADH-GOGAT) while *OsGOGAT3* and *OsGOGAT4* use reduced ferredoxin (Fd-GOGAT). Expression of the non plastidic isoforms, that is *OsGS1;1*, *OsGS1;2*, *OsGS1;3*, *OsGOGAT1* and *OsGOGAT2*, was assessed in roots of NM and AM plants.



▲ **Figure 28.** Effect of N and the AM symbiosis on the expression of  $\text{NH}_4^+$  transporter (*OsAMT*) genes. **(A)** Expression of the AMT members of the AMT1 subfamily and **(B)** expression of the AMT2 subfamily members. qRT-PCR relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method. The Ct values obtained for each sample were normalized with *OsEF1 $\alpha$*  as internal control. Values are averages  $\pm$  S.E. (n = 3). Different letters stand for significant differences between treatments at  $p < 0.05$ . White and black bars are for NM and AM plants, respectively.

In our experimental conditions, *OsGS1;3* transcript levels were below the detection limit and *OsGS1;2* transcripts more abundant than those of *OsGS1;1*. In roots of NM plants, both genes were up-regulated under N-limited conditions. Expression of *OsGS1;1* and *OsGS1;2* was not changed by

the development of the symbiosis in the high-N plants. However, when the plants were grown under the low-N conditions, colonization with *G. intraradices* decreased *OsGS1;1* and *OsGS1;2* expression to similar levels as those observed in plants fertilized with the high-N nutrient solution [Figure 29A].

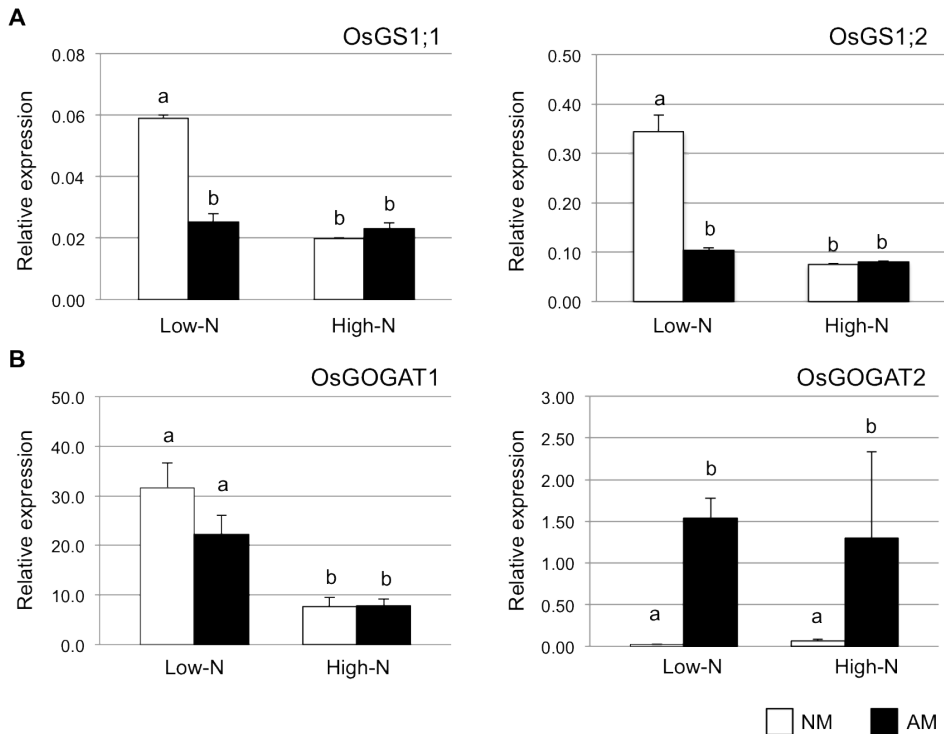
*OsGOGAT1* transcripts were more abundant than *OsGOGAT2* transcripts in the roots of plants of all treatments, being the *OsGOGAT2* transcript levels in the NM roots very close to the detection limit. *OSGOGAT1* transcript accumulation was not significantly affected by the development of the symbiosis. However, in the roots of both NM and AM plants *OsGOGAT1* gene expression was induced significantly when the plants were grown under N-limited conditions. Expression of *OsGOGAT2* was strongly induced in the roots of the low- and high-N supplied AM plants (20-70 fold induction, depending on the biological sample, compared to the NM plants) [Figure 29B].

#### 4. Discussion

The importance of AM fungi for plant N nutrition is a topic of controversy (Smith and Smith, 2011). In this study we have shown that in rice plants, the AM fungus *G. intraradices* contributes to shoot N concentration when the plants were grown with a low-N supply and that colonization by *G. intraradices* strongly induced the expression of an  $\text{NH}_4^+$  transporter (*OsAMT3;1*) and of a NADH-GOGAT isozyme (*OsGOGAT2*) in roots of rice plants grown both with a low- and high-N supply.

Mycorrhization did result in an advantage in terms of P nutrition, with low- and high-N supplied AM plants having higher P shoot concentrations. However, mycorrhization resulted in an advantage in terms of N nutrition for the host plant only at a low-N supply. These observations confirm previous findings and suggestions that in soils with high mineral N supply, the contribution of AM fungi to shoot N content is likely to be small compared with uptake by the roots (Hawkins et al. 2000; Hodge 2003). However, the case is different when AM fungal hyphae have access to N

sources that are not accessible to roots (George et al. 1992; Frey and Schüepp 1993; Leigh et al. 2009). The finding that the MGR of the low-N plants was negative and that AM plants with lower N supply had higher mycorrhization levels indicates a higher investment in the symbiosis under the low-N conditions. This higher investment can be presumed to have been driven by higher N needs by the plant, all other conditions being the same, but was seemingly independent of an actual N nutrition benefit.



▲ **Figure 29.** Effect of N and the AM symbiosis on the expression of *OsGS1* (A) and *OsGOGAT* (B) genes. qRT-PCR relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta CT}$  method. The Ct values obtained for each sample were normalized with *OsEF1 $\alpha$*  as internal control. Values are averages  $\pm$  S.E. (n = 3). Different letters stand for significant differences between treatments at  $p < 0.05$ . White and black bars are for NM and AM plants, respectively.

Strong induction of *OsAMT3;1* gene expression in AM roots add to the growing body of evidence that AM host plants have  $\text{NH}_4^+$  transporters that up-regulated when plants are colonized by AM fungi (Frenzel et al., 2005; Hohnjec et al., 2005; Guether et al., 2009a; Kobae et al., 2010b; Ruzicka et al., 2012). Specific expression of these up-regulated AMT genes in arbuscule

colonized cortical root cells has been shown in the legumes *M. truncatula* (Gomez et al., 2009), *L. japonicus* (Guether et al., 2009b) and *G. max* (Kobae et al., 2010b). Our phylogenetic analysis revealed that the AM-induced rice  $\text{NH}_4^+$  transporter *OsAMT3;1* belongs to the subfamily 2 of plant AMTs and that is closely related to the legume AMT transporters whose transcripts are expressed in arbuscule-colonized cortical root cells and that are, therefore, likely expressed in the periarbuscular membrane. These data suggest that role of the rice AMT transporter encoded by *OsAMT3;1* is to scavenge  $\text{NH}_4^+$  from the cortical apoplast surrounding the mycorrhizal fungal structures. Similarly to *L. japonicus* (Guether et al., 2009a, 2009b) and *M. truncatula* (Gomez et al., 2009), in rice, only one AM-inducible AMT2 subfamily gene has been found to date. This is in contrast to soybean and tomato, in which four and two, respectively, AM-inducible AMT2 subfamily genes have been found in mycorrhizal roots (Kobae et al., 2010b; Ruzicka et al., 2012). Contrary to what was expected, *OsAMT3;1* activation in AM roots did not seem to depend on the N supply, and be limited to N limiting conditions, since *OsAMT3;1* was similarly expressed under both N supplies. This was in contrast to the mycorrhizal Pi uptake mechanism, which is repressed by both plant and soil Pi (Nagy et al., 2009), but it is in accordance with what was found in tomato where the mycorrhizal-specific *AMT4* and *AMT5* genes are similarly expressed under different N conditions (Ruzicka et al., 2012).

Different authors have suggested that the AMT1 subfamily genes in rice may be crucial in  $\text{NH}_4^+$  uptake from the soil (Kumar et al., 2003; Sonoda et al., 2003; Li and Shi, 2006). Transcriptional regulation of the AMT1 subfamily genes in the roots of NM plants by the environmental N availability, with higher expression of *OsAMT1;1* and *OsAMT1;3* under N limiting conditions, is in accordance with previous reports in rice roots (Sonoda et al., 2003). These data suggest that the gene products of *OsAMT1;1* and *OsAMT1;3* may make a major contribution to root  $\text{NH}_4^+$  uptake under N limiting conditions. Down-regulation of these two genes in the AM roots of the plants grown with a low-N supply suggests that these transporters are not so important when the alternative mycorrhizal N uptake pathway is activated. Down-regulation of *GmAMT1;6* in mycorrhizal soybean roots has been previously reported (Kobae et al., 2010b).

Contrary to what was expected, activation of the mycorrhizal N uptake in rice did not seem to depend on the N supply, and be limited to N limiting conditions, since *OsAMT3;1* was similarly expressed under both N supplies. This was in contrast to the mycorrhizal Pi uptake mechanism, which is repressed by both plant and soil Pi (Nagy et al., 2009). The two nutrient uptake pathways in an AM root, though additive, are potentially independent, since they involve uptake from different soil locations (rhizosphere or the mycorrhizosphere, located several centimetres from the roots) and expression of different transporters in different cell types (epidermal or cortical cells). In some plant species-AM fungi combinations, it has been found that AM colonization results in complete inactivation of the direct Pi uptake pathway, and 100% of the phosphorus in plant tissues is provided by the AM fungus (Smith et al., 2004). Given that the N content of the rice plants with a high-N supply was not significantly changed by the development of the symbiosis, the strong up-regulation of *OsAMT3;1* in the AM roots suggests that under these N conditions AM fungal colonization reduces N uptake through the direct pathway. Isotopic labelling experiments and expression analysis of the nitrate transporters are needed to determine whether this would be the case.

These data altogether show a parallelism with the mechanisms of P uptake by AM roots and support the existence of a mycorrhiza-specific N uptake pathway and the hypothesis that the direct nutrient uptake pathway can be “switched off” and substituted by the mycorrhizal uptake pathway (Bucher 2007; Javot et al., 2007; Smith and Smith, 2011). Evidence for mycorrhizal pathways for additional nutrients has emerged from the recent identification of potassium, sulphate, copper and iron transporter genes, which are also specifically expressed or induced in mycorrhizal roots (Gomez et al., 2009; Guether et al., 2009a; Benedito et al., 2010; Casieri et al., 2012; Gaude et al., 2012).

The GS/GOGAT cycle plays an important role in  $\text{NH}_4^+$  assimilation. Independently of the N supply, the highest abundance of *OsGS1;2* and *OsGOGAT1* transcripts compared to those of *OsGS1;1* and *OsGOGAT2*, respectively, suggests that *OsGS1;2* and *OsGOGAT1* isoforms are the main

responsible for the primary assimilation of N in rice roots, which agrees with previous reports (Tabuchi et al., 2007). Up-regulation of *OsGS1;1* and *OsGS1;2* gene expression when NM plants were grown under a low-N supply agrees with previous observations in hydroponic cultures (Zhao and Shi, 2006). Kinetic analyses of the *OsGS1;1* and *OsGS1;2* gene products showing that both enzymes have a high affinity for  $\text{NH}_4^+$  (Ishiyama et al., 2004a) and transcript accumulation at the surface cell layers at low-N (Ishiyama et al., 2004b) support the importance of these enzymes in promoting rapid conversion of  $\text{NH}_4^+$  to glutamine at the surface cell layers that are in contact with the soil particularly under low N conditions. Our finding that in the roots of the AM plants expression of *OsGS1;1* and *OsGS1;2* did not increase under low N-conditions could be explained by the higher N status of these roots compared to those of the NM plants as a consequence of the activation of the mycorrhizal N uptake pathway. Contrary to what was expected, transcriptional activation of GS genes in mycorrhizal roots was not observed. It could be due to a dilution effect, given that this response should be localized in specific cell types, or because these enzymes are post-transcriptionally regulated by the symbiosis. In fact, there is now a growing body of evidence that GS activity is not only regulated at the level of gene expression but also by post-translational modifications (Moorhead *et al.* 1999; Finnemann and Schjoerring, 2000; Li *et al.*, 2006).

Nevertheless, *OsGOGAT2* expression was strongly induced (at least 20-fold) in AM roots compared to NM roots under both N conditions. In spite of the high induction, transcript abundance of *OsGOGAT2* was low. This could be explained as a consequence of localized expression, possibly in arbuscule-colonized cortical cells. The physiological role of *OsGOGAT2* in rice is not yet known. Tabuchi et al. (2007) have reported that *OsGOGAT2* was expressed mainly in fully expanded leaf blades and leaf sheaths, but maintained a low and constant level of expression in roots, and Tamura et al. (2011b) suggested *OsGOGAT2* to be important in the process of senescence and remobilization of leaf N. Our data suggest that in AM roots this isozyme may play a key role in the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  derived from the AM fungus through the mycorrhizal N uptake pathway. Similarly, in the symbiotic

interaction of *Rhizobium* with *Medicago sativa* (Trepp et al., 1999) and *Phaseolus vulgaris* (Blanco et al., 2008), NADH-GOGAT is strongly expressed in nodules and has been shown to play a key role in the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  derived from symbiotic  $\text{N}_2$  fixation. Specific induction of OsGOGAT2 expression in M roots indicates a participation of the GS/GOGAT pathway in the primary assimilation of the mycorrhizal derived  $\text{NH}_4^+$ .

Cytosolic  $\text{NH}_4^+$  supplied via the OsAMT3;1 AM-inducible transporter could act as a signalling molecule in the root, possibly in arbuscule-colonized cortical cells, triggering the induction of N assimilative enzymes, such as OsGOGAT2. Curiously, induction of OsAMT3.1 and OsGOGAT2 was observed in AM roots with both N supplies, indicating that the activation of this putative mycorrhizal N uptake pathway is independent of N availability and plant N needs. The activation of OsGOGAT2 without improvement of N uptake by the AM plants reinforces the possibility of its belonging to a specific mycorrhizal pathway of N assimilation, rather than it being activated as a response to increased N uptake.

In conclusion, we have identified an AM-inducible  $\text{NH}_4^+$  transporter and an AM-inducible NADH-GOGAT gene in rice roots. This work represents the first report on the specific activation of a GOGAT isozyme in a mycorrhizal root. The high activation of *OsAMT3;1* and *OsGOGAT2* expression in mycorrhizal roots suggests that this transporter is likely involved in the mycorrhizal N uptake route and that the gene product of *OsGOGAT2* is involved in the same mycorrhizal N uptake/assimilation pathway.

#### Capítulo basado en:

Pérez-Tienda J, Corrêa A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. Transcriptional regulation of host  $\text{NH}_4^+$  transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots (En preparación).

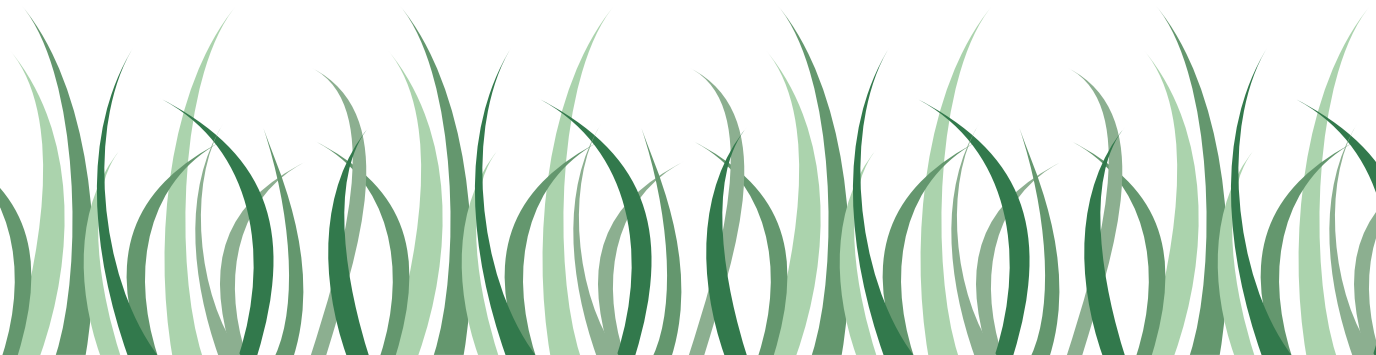






## Conclusiones

IX





## Conclusiones

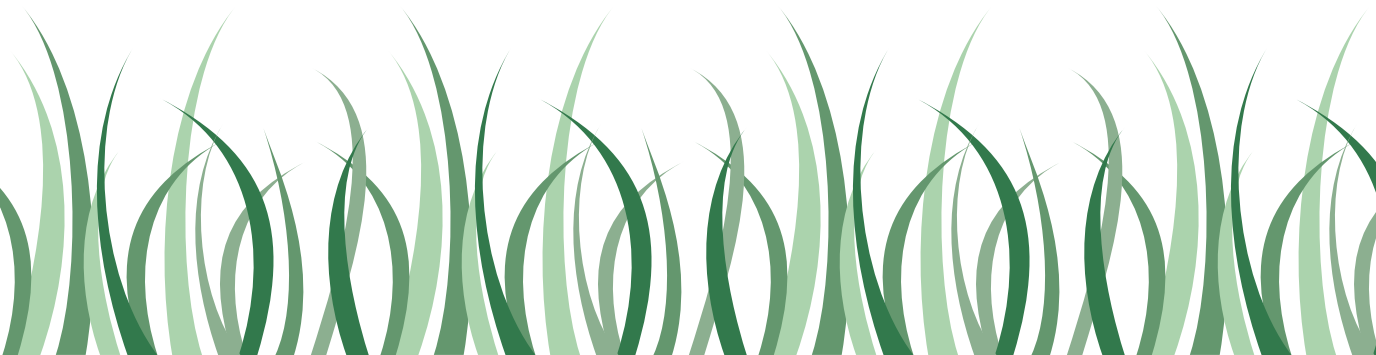
1. La cinética de absorción de  $\text{NH}_4^+$  en el micelio extrarradical de *Glomus intraradices* sigue un patrón bifásico en el que se distinguen al menos dos componentes, uno saturable de alta afinidad que funciona cuando la concentración externa de  $\text{NH}_4^+$  es inferior a  $100 \mu\text{M}$  y otro no saturable que opera a concentraciones superiores a  $1 \text{ mM}$ . Ambos sistemas de transporte, especialmente el de alta afinidad, requieren para su funcionamiento de energía metabólica y de la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática, lo que indica que operan mediante un sistema de transporte secundario de simporte con protones.
2. El gen *GintAMT2* de *Glomus intraradices* codifica un transportador de  $\text{NH}_4^+$  que se localiza en la membrana plasmática y se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del hongo. Aunque las cinéticas del transporte mediado por *GintAMT2* no han podido determinarse, el análisis bioinformático de su secuencia sugiere que codifica un transportador de alta afinidad. Este transportador, junto con el transportador *GinAMT1* previamente identificado en este hongo, serían las proteínas a través de las cuales se produce la absorción de  $\text{NH}_4^+$  por el micelio extrarradical cuando las concentraciones externas de este elemento son bajas.
3. *Glomus intraradices* dispone de dos vías para la asimilación de  $\text{NH}_4^+$ , una a través del ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) y otra a través de la NADP-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH). El análisis de la expresión de los genes que codifican estas enzimas, *GintGOGAT* y *GintGDH1*, en el micelio extrarradical sometido a diferentes tratamientos de nitrógeno sugiere que en presencia de nitrógeno, la asimilación primaria del  $\text{NH}_4^+$  ocurre fundamentalmente a través de la vía GS/GOGAT, mientras que en condiciones de ayuno de nitrógeno ocurre a través de la GDH.

4. La expresión de los genes *GintAMT2*, *GintGOGAT* y *GintGDH1* en el micelio intrarradical, y más específicamente en los arbusculos, sugiere un papel importante del metabolismo nitrogenado en estas estructuras fúngicas. *GintAMT2* podría estar involucrado en la captación de parte del  $\text{NH}_4^+$  liberado por el hongo a la interfase simbiótica, compitiendo de esta manera con la planta por el N presente en el apoplasto interfacial. La asimilación del  $\text{NH}_4^+$  en el micelio intrarradical ocurre fundamentalmente a través de *GintGOGAT* y en menor medida mediante la actuación de *GintGDH1*.
5. En plantas de arroz, el desarrollo de la simbiosis en condiciones limitantes de nitrógeno provocó una disminución en los niveles de expresión de los transportadores *OsAMT1;1* y *OsAMT1;3* pertenecientes a la subfamilia 1 de los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  de plantas y de los genes *OsGS1;1* y *OsGS1;2* que codifican dos isoformas de la glutamina sintetasa citosólica de arroz.
6. En plantas micorrizadas de arroz se activa de forma específica e independiente de la concentración externa de N, la expresión de los genes *OsAMT3;1* y *OsGOGAT2*, que codifican un transportador de  $\text{NH}_4^+$  perteneciente a la subfamilia 2 de los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  de plantas y una glutamato sintasa dependiente de NADH, respectivamente. Las proteínas codificadas por estos genes serían las responsables de la absorción y asimilación del nitrógeno que la planta recibe a través de la vía micorrícica presumiblemente a nivel de las células corticales colonizadas por arbusculos. La inducción de la vía micorrícica de captación de nitrógeno en arroz ocurre independientemente de que el desarrollo de la simbiosis resulte en un incremento en la concentración de nitrógeno en la planta hospedadora.



## Bibliografía

X





## Bibliografía

- Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant and Cell Physiology* 51:1104-1117
- Alberton O, Kuyper TW, Gorissen A (2005) Taking mycocentrism seriously: mycorrhizal fungal and plant responses to elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* 167:859-868
- Albrecht C, Geurts R, Lapeyrie F, Bisseling T (1998) Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes PsENOD5 and PsENOD12A. *The Plant Journal* 15:605-614
- Alexander T, Toth R, Meier R, Weber HC (1989) Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany* 67:2505-2513
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402
- Ames RN, Reid CPP, Porter LK, Cambardella C (1983) Hyphal uptake and transport of nitrogen from two <sup>15</sup>N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 95:381-396
- Andrade SLA, Einsle O (2007) The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Molecular Membrane Biology* 24:357-365
- Aroca R, Bago A, Sutka M, Paz JA, Cano C, Amodeo G, Ruiz-Lozano JM (2009) Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:1169-1178
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses?. *New Phytologist* 173:808-816



- Avendaño A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L, Gonzalez A (1997) GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 179:5594-5597
- Azcón-Aguilar C, Bago B, Barea JM (1999) Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 391–407
- Azcón-Aguilar C, García-García F, Barea JM (1991) Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. En: Olivares J, Barea JM (eds) *Fijación y movilización biológica de nutrientes. Nuevas tendencias (Vol. 2)*. CSIC, Madrid, pp. 129-147
- Azcón R (1987) Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biology and Biochemistry* 19:417-419
- Azcón R, Ruiz-Lozano JM, Rodríguez R (2001) Differential contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to plant nitrate uptake ( $^{15}\text{N}$ ) under increasing N supply to the soil. *Canadian Journal of Botany* 79:1175-1180
- Bago B (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:263-274
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y (1998b) Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 139:375-388
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y (1998a) Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90:52-62
- Bago B, Bécard G (2002) Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 33-48
- Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y (2004) Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 96:452-462
- Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *New Phytologist* 149:4-8
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* 131:1496-1507
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Becard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 121:263-271

- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124:949-957
- Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar-Hill Y (2002a) Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. Metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* 244:189-197
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón-Aguilar C (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* 133:273-280
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2002b) Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128:108-124
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H, Hohnjec N (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 152:1000-1014
- Balaji B, Ba AM, LaRue TA, Tepfer D, Piché Y (1994) *Pisum sativum* mutants insensitive to nodulation are also insensitive to invasion in vitro by the mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Plant Science* 102:195-203
- Balestrini R, Berta G, Bonfante P (1992) The plant nucleus in mycorrhizal roots: positional and structural modifications. *Biology of the Cell* 75:235-243
- Balestrini R, Bonfante P (2005) The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall?. *Plant Biosystems* 139:8-15
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1055-1062
- Barea JM, Jeffries P (1995) Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil Plant Systems. In: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg, pp. 521-559
- Barea JM, Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Azcón R (2008) Mycorrhizal symbioses. In: White PJ, Hammond JP (eds) *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, vol 7. *Plant Ecophysiology*. Springer, Netherlands, pp 143-163
- Barea JM, Toro M, Azcón R (2007) The use of <sup>32</sup>P isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of phosphate-solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi at increasing plant P availability. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds) *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, vol 102. *Developments in Plant and Soil Sciences*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 223-227
- Barel I, MacDonald DW (1993) Enzyme defects in glutamate-requiring strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *Fems Microbiology Letters* 113:267-272
- Bartnicki-Garcia S (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22:87-108

- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108:211-218
- Bécard G, Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174:62-68
- Benabdellah K, Azcón-Aguilar C, Valderas A, Speziga D, Fitzpatrick TB, Ferrol N (2009) GintPDX1 encodes a protein involved in vitamin B6 biosynthesis that is up-regulated by oxidative stress in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 184:682-693
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15:620-627
- Benedito VA, Li H, Dai X, Wandrey M, He J, Kaundal R, Torres-Jerez I, Gomez SK, Harrison MJ, Tang Y, Zhao PX, Udvardi MK (2010) Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiology* 152:1716-1730
- Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel JC (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology* 46:229-236
- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalón-Delmas N (2008) GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* 148:402-413
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldán V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalón-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4:1239-1247
- Bethlenfalvai GJ, Reyes-Solis MG, Camel SB, Ferrera-Cerrato R (1991) Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal mycelium. *Physiologia Plantarum* 82:423-432
- Bever JD, Wang M (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi: Hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature* 433:733-737
- Bianciotto V, Bonfante P (1992) Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 96:1071-1076
- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, Vandamme P (2003) '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:121-124
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P, Perotto S (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4503-4509

- Biswas K, Morschhauser J (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 56:649-669
- Blakey D, Leech A, Thomas GH, Coutts G, Findlay K, Merrick M (2002) Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. *Biochem J* 364:527-535
- Blanco L, Reddy PM, Silvente S, Bucciarelli B, Khandual S, Alvarado-Affantranger X, Sanchez F, Miller S, Vance C, Lara-Flores M (2008) Molecular cloning, characterization and regulation of two different NADH-glutamate synthase cDNAs in bean nodules. *Plant Cell and Environment* 31:454-472
- Blee KA, Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology* 50:197-211
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189-207
- Bonfante, P (2001) At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In: Esser K, Hock B (eds) *The Mycota Vol. 9*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 45-61
- Bonfante-Fasolo P (1984) Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) *VA Mycorrhizae*. CRC Press, Boca Raton, pp. 5-33
- Bonfante P, Genre A (2008) Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* 13:492-498
- Bonfante P, Perotto S (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130:3-21
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Breuninger M, Requena N (2004) Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology* 41:794-804
- Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N (2004) Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41:542-552
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159:567-584
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173:11-26
- Bücking H, Shachar-Hill Y (2005) Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* 165:899-911
- Caldana C, Scheible W-R, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods* 3:7

- Camañes G, Cerezo M, Primo-Millo E, Gojon A, Garcia-Agustin P (2009) Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by N in *Citrus* plants. *Planta* 229:331-342
- Campos-Soriano L, Gómez-Ariza J, Bonfante P, San Segundo B (2011) A rice calcium-dependent protein kinase is expressed in cortical root cells during the presymbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* 11:90
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P (2008) Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* 147:429-437
- Casieri L, Gallardo K, Wipf D (2012) Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulphate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta* 235:1431-1447
- Cerezo M, Tillard P, Gojon A, Primo-Millo E, García-Agustín P (2001) Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta* 214:97-105
- Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P (2011) Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* 189:347-355
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Bécard G, Barker DG (2002) Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 156:265-273
- Chabot S, Bécard G, Piché Y (1992) Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84 (3):315-321
- Chalot M, Blaudez D, Brun A (2006) Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* 11:263-266
- Cheng X, Baumgartner K (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils* 40:406-412
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytologist* 149:539-554
- Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23:867-902
- Clarkson D, Gojon A, Saker L, Wiersema P, Purves J, Tillard P, Arnold G, Paans A, Vaalburg W, Stulen I (1996) Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: direct comparison of <sup>13</sup>N and <sup>15</sup>N tracing. *Plant, Cell & Environment* 19:859-868
- Coffman JA, Rai R, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG (1996) Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16 :847-858

- Cooke JC, Gemma JN, Koske RE (1987) Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79:331-333
- Cooper TG, Sumrada RA (1983) What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?. *J Bacteriol* 155:623-627
- Coschigano PW, Miller SM, Magasanik B (1991) Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11:4455-4465
- Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M (2007) The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* 174:137-150
- Crawford NM, Forde BG (2002) Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book* 1:e0011
- Crawford NM, Glass ADM (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3:389-395
- Croll D, Sanders IR (2009) Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evolutionary Biology* 9:13
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14:1188-1190
- Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, Ambus P, Requena N, Martins-Loução MA, Jakobsen I (2007) Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 144:782-792
- D'Apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, El Alaoui H, Barbulova A, Betti M, Dimou M, Katinakis P, Marquez A, Marini A-M, Udvardi MK, Chiurazzi M (2004) Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. *Plant Physiology* 134:1763-1774
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* 165:261-271
- de Morais Jr. MA (2003) The NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* responds to nitrogen repression similarly to *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:334-338
- Deguchi Y, Banba M, Shimoda Y, Chechetka SA, Suzuri R, Okusako Y, Ooki Y, Toyokura K, Suzuki A, Uchiumi T, Higashi S, Abe M, Kouchi H, Izui K, Hata S (2007) Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation. *DNA Res* 14:117-133
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, González A (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 276:43775-43783
- Denison RF, Kiers ET (2011) Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology* 21:R775-R785

- Dickson S (2004) The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 163:187-200
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytologist* 161:387-392
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012) Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1118650109
- Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002a) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 244:231-237
- Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2000) The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Current Genetics* 37:112-118
- Ferrol N, González-Guerrero M, Valderas A, Benabdellah K, Azcón-Aguilar C (2009) Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews* 8:551-559
- Ferrol N, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2002c) Arbuscular mycorrhiza induces ATPases and membrane nutrient transport mechanisms. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 113-122
- Ferrol N, Pérez-Tienda J (2009) Coordinated nutrient exchange in arbuscular mycorrhiza. In: Azcón-Aguilar C, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (eds) *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp 73-87
- Ferrol N, Pozo MJ, Antelo M, Azcón-Aguilar C (2002b) Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1683-1687
- Filetici P, Martegani MP, Valenzuela L, Gonzalez A, Ballario P (1996) Sequence of the GLT1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the domain structure of yeast glutamate synthase. *Yeast* 12:1359-1366
- Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59:1115-1126
- Finnemann J, Schjoerring JK (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal* 24:171-181
- Fitter AH (2005) Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93:231-243
- Fitter AH, Graves JD, Watkins NK, Robinson D, Scrimgeour C (1998) Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Functional Ecology* 12:406-412

- Fitter AH, Heinemeyer A, Staddon PL (2000) The impact of elevated CO<sub>2</sub> and global climate change on arbuscular mycorrhizas: a mycocentric approach. *New Phytologist* 147:179-187
- Forbes PJ, Millam S, Hooker JE, Harrier LA (1998) Transformation of the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by particle bombardment. *Mycological Research* 102:497-501
- Forde BG, Walch-Liu PIA (2009) Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant, Cell & Environment* 32 :682-693
- Forde BG, Clarkson DT (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. In: Callow JA (ed) *Advances in Botanical Research*, Volume 30. Academic Press, pp 1-90
- Franken P (2002) A plea for a concerted nomenclature for AM fungal genes. *Mycorrhiza* 12:319-319
- Frenzel A, Manthey K, Perlick AM, Meyer F, Pühler A, Küster H, Krajinski F (2005) Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific *Medicago truncatula* lectin genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:771-782
- Frey B, Schüepp H (1993) Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124:221-230
- Froeliger E, Carpenter B, Froeliger E (1996) NUT1, a major nitrogen regulatory gene in *Magnaporthe grisea*, is dispensable for pathogenicity. *Molecular and General Genetics* 251:647-656
- Fu YH, Marzluf GA (1987) Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:8243-8247
- Gachomo E, Allen JW, Pfeiffer PE, Govindarajulu M, Douds DD, Jin H, Nagahashi G, Lammers PJ, Shachar-Hill Y, Bücking H (2009) Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytologist* 184:399-411
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:280-300
- Gandolfi A, Sanders IR, Rossi V, Menozzi P (2003) Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Molecular Biology and Evolution* 20:754-761
- García Garrido JM, León Morcillo RJ, Martín Rodríguez JA, Ocampo Bote JA (2010) Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:651-664
- García-Garrido J, Lenzemo V, Castellanos-Morales V, Steinkellner S, Vierheilig H (2009) Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19:449-459
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2007) Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* 129:737-746



- García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2005) Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza* 15:489-496
- Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* 69:510-528
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell Online* 11:937-948.
- Genre A, Bonfante P (2007) Check-in procedures for plant cell entry by biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1023-1030
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20:1407-1420
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17:3489-3499
- George E, Häussler K-U, Vetterlein D, Gorgus E, Marschner H (1992) Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany* 70:2130-2137
- Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B (1997) Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 160:239-251
- Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8:1871-1883
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S (2000) Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211:609-613
- Gietz RD, Schiestl RH (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2:31-34
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68:1077-1090
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151:717-724
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84:489-500.
- Glass ADM, Siddiqi MY (1995) Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava HS, Singh RP (eds) Nitrogen nutrition in higher plants. Associated Publishing Company, New Delhi, pp. 21-56.

- Glassop D, Godwin RM, Smith SE, Smith FW (2007) Rice phosphate transporters associated with phosphate uptake in rice roots colonised with arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 85:644-651
- Gobert A, Plassard C (2008) The beneficial effect of mycorrhizae on N utilization by the host-plant: myth or reality? In: Varma A (ed) *Mycorrhiza*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 209-240
- Göhre V, Paszkowski U (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115-1122
- Gollotte A, L'Haridon F, Chatagnier O, Wettstein G, Arnould C, Van Tuinen D, Gianinazzi-Pearson V (2006) Repetitive DNA sequences include retrotransposons in genomes of the Glomeromycota. *Genetica* 128:455-469
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ (2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol* 9:10
- Gómez-Ariza J, Balestrini R, Novero M, Bonfante P (2009) Cell-specific gene expression of phosphate transporters in mycorrhizal tomato roots. *Biology and Fertility of Soils* 45:845-853
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189-194
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production?. *Trends in Plant Science* 9:597-605
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin HR, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435:819-823
- Guescini M, Stocchi L, Sisti D, Zeppa S, Polidori E, Ceccaroli P, Saltarelli R, Stocchi V (2009) Characterization and mRNA expression profile of the TbNre1 gene of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *Current Genetics* 55:59-68
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P (2009a) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 182:200-212
- Guether M, Neuhauser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P (2009b) A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 150:73-83
- Güimil S, Chang HS, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ionidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, Briggs SP, Paszkowski U (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:8066-8070

- Gutiérrez A, Morte A, Honrubia M (2003) Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia claveryi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza* 13:299-307
- Gutjahr C, Novero M, Guether M, Montanari O, Udvardi M, Bonfante P (2009) Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* 183:53-61
- Gutjahr C, Novero M, Welham T, Wang T, Bonfante P (2011) Root starch accumulation in response to arbuscular mycorrhizal colonization differs among *Lotus japonicus* starch mutants. *Planta* 234:639-646
- Guttenberger M (2000) Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta* 211:299-304
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166:557-580
- Hanlon MT, Coenen C (2011) Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *New Phytologist* 189:701-709
- Harper C, Hayward D, Kidd M, Wiid I, van Helden P (2010) Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiology* 10:138
- Harrier LA, Millam S (2001) Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi: Progress and perspectives. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 18:25-33
- Harrier LA, Watson CA (2004) The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science* 60:149-157
- Harrison MJ (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* 9:491-503
- Harrison MJ, van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626-629
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14:2413-2429
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68:101-110
- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:275-285
- He X, Xu M, Qiu GY, Zhou J (2009) Use of <sup>15</sup>N stable isotope to quantify nitrogen transfer between mycorrhizal plants. *Journal of Plant Ecology* 2:107-118
- He XH, Critchley C, Bledsoe C (2003) Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:531-567

- Helber N, Requena N (2008) Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 177:537-548
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011) A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23:3812-3823
- Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, García Garrido JM (2007) Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175:554-564
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1992) Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Canadian Journal of Botany* 70:2032-2040
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111:509-547
- Hijri M, Sanders IR (2004) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* 41:253-261
- Hijri M, Sanders IR (2005) Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433:160-163
- Ho I, Trappe JM (1973) Translocation of  $^{14}\text{C}$  from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244:30-31
- Ho I, Trappe JM (1975) Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67:886-888
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular California Agricultural Experiment Station* 347:1-32
- Hodge A (2003) Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization. *New Phytologist* 157:303-314
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413:297-299

- Hodge A, Helgason T, Fitter AH (2010) Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 3:267-273
- Hodge A, Robinson D, Fitter A (2000) Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science* 5:304-308
- Hohnjec N, Perlick AM, Pühler A, Küster H (2003) The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:903-915
- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 137:1283-1301
- Holmes AR, Collings A, Farnden KJF, Shepherd MG (1989) Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *Journal of General Microbiology* 135:1423-1430
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1998) Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41:422-428
- Hosny M, Pais de Barros J-P, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1997) Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fungal Genetics and Biology* 22:103-111
- Howitt SM, Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465:152-170
- Huie MA, Baker HV (1996) DNA-Binding properties of the yeast transcriptional activator, Gcr1p. *Yeast* 12:307-317
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Laugraud A, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, Mistry J, Mitchell A, Mulder N, Natale D, Orengo C, Quinn AF, Selengut JD, Sigrist CJA, Thimma M, Thomas PD, Valentin F, Wilson D, Wu CH, Yeats C (2009) InterPro: The integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research* 37:D211-D215
- Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, Yamaya T, Takahashi H (2004) Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant and Cell Physiology* 45:1640-1647
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H (2004b) Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279:16598-16605
- Ireland RJ, Lea PJ (1999) The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: Singh BK (ed) *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 49-109

- Jahn TP, Møller ALB, Zeuthen T, Holm LM, Klærke DA, Mohsin B, Kühlbrandt W, Schjoerring JK (2004) Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *Febs Letters* 574:31-36
- Jakobsen I (1994) Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. *Plant and Soil* 159:141-147
- Jämtgård S, Näsholm T, Huss-Danell K (2008) Characteristics of amino acid uptake in barley. *Plant and Soil* 302:221-231
- Jany JL, Pawlowska TE (2010) Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. *The American Naturalist* 175:424-435
- Jargeat P, Cosseau C, Ola'h B, Jauneau A, Bonfante P, Batut J, Bécard G (2004) Isolation, free-living capacities, and genome structure of '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*', the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology* 186:6876-6884
- Javelle A, Andre B, Marini AM, Chalot M (2003b) High-affinity ammonium transporters and nitrogen sensing in mycorrhizas. *Trends in Microbiology* 11:53-55
- Javelle A, Chalot M, Soderstrom B, Botton B (1999) Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and ectomycorrhizas. *Fems Microbiology Ecology* 30:355-366
- Javelle A, Lupo D, Zheng L, Li XD, Winkler FK, Merrick M (2006) An unusual twin-His arrangement in the pore of ammonia channels is essential for substrate conductance. *Journal of Biological Chemistry* 281:39492-39498
- Javelle A, Morel M, Rodríguez-Pastrana BR, Botton B, Andre B, Marini AM, Brun A, Chalot M (2003a) Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* 47:411-430
- Javelle A, Rodríguez-Pastrana BR, Jacob C, Botton B, Brun A, Andre B, Marini AM, Chalot M (2001) Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Febs Letters* 505:393-398
- Javot H, Penmetza RV, Breuillin F, Bhattarai KK, Noar RD, Gomez SK, Zhang Q, Cook DR, Harrison MJ (2011) *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 68:954-965
- Javot H, Penmetza RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:1720-1725
- Jeffries P, Barea JM (2001) Arbuscular mycorrhiza - a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: Hock B (ed) *The Mycota Vol. IX: Fungal associations*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 95-113
- Jiang RHY (2011) Dynamics of effectors in host-pathogen interactions. *Mycology* 2:210-217

- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168:687-696
- Jin HR, Jiang DH, Zhang PH (2011) Effect of carbon and nitrogen availability on metabolism of amino acids in germinating spores of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* 21:432-442
- Jin HR, Liu J, Liu J, Huang XW (2012) Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Science China Life Sciences* 55:474-482
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA (1996) Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 133:705-712
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1992) Hyphal transport of  $^{15}\text{N}$ -labeled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytologist* 122:281-288
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1993) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 3. Hyphal Transport of  $^{32}\text{P}$  and  $^{15}\text{N}$ . *New Phytologist* 124:61-68
- Johansen A, Jensen ES (1996) Transfer of N and P from intact or decomposing roots of pea to barley interconnected by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Soil Biology and Biochemistry* 28:73-81
- Jongbloed RH, Clement JMAM, Borst-Pauwels GWFH (1991) Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$  uptake by ectomycorrhizal fungi. Effect of  $\text{NH}_4^+$  on  $\text{K}^+$  uptake. *Physiologia Plantarum* 83:427-432.
- Kasianowicz J, Benz R, McLaughlin S (1984) The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *Journal of Membrane Biology* 82:179-190
- Kersten MASH, Arninkhof MJC, Op Den Camp HJM, Van Griensven LJLD, Van Der Drift C (1999) Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1428:260-272
- Khademi S, O'Connell Iii J, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJW, Stroud RM (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 135 Å. *Science* 305:1587-1594
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bücking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880-882
- Kim JH, Johnston M (2006) Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 281:26144-26149
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current biology* 21:1204-1209

- Kobae Y, Hata S (2010a) Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant and Cell Physiology* 51:341-353
- Kobae Y, Tamura Y, Takai S, Banba M, Hata S (2010b) Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant and Cell Physiology* 51:1411-1415
- Koltai H, Dor E, Hershenhorn J, Joel DM, Weininger S, Lekalla S, Shealtiel H, Bhattacharya C, Eliahu E, Resnick N, Barg R, Kapulnik Y (2010) Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* 29:129-136
- Koricheva J, Gange AC, Jones T (2009) Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology* 90:2088-2097
- Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131:952-962
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:9823-9828
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany* 62:1455-1466
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P (2002) Mth1, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology* 4:754-761
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193:970-984.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinezrossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW, Arst HN (1990) The regulatory gene AreA mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* - mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *Embo Journal* 9:1355-1364
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR (2001) Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414:745-748
- Kumar A, Silim SN, Okamoto M, Siddiqi MY, Glass ADM (2003) Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. *Plant Cell and Environment* 26:907-914
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685



- Lamoureux G, Javelle A, Baday S, Wang S, Bernèche S (2010) Transport mechanisms in the ammonium transporter family. *Transfusion Clinique Et Biologique* 17:168-175.
- Lanfranco L, Delpero M, Bonfante P (1999) Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8:37-45
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8139-8144
- Lea PJ, Mifflin BJ (2003) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:555-564.
- Lee J, Young JPW (2009) The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* 183:200-211
- Leigh J, Hodge A, Fitter AH (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* 181:199-207
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell* 15:2218-2232
- Li R-J, Hua W, Lu Y-T (2006) *Arabidopsis* cytosolic glutamine synthetase AtGLN1;1 is a potential substrate of AtCRK3 involved in leaf senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342:119-126
- Li SM, Shi WM (2006) Quantitative characterization of nitrogen regulation of OsAMT1;1, OsAMT1;2, and OsAMT2;2 expression in rice seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 53:837-843
- Linderman RG (1992) Versicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay GJ, Linderman RG (eds) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA Special Publication, Madison, pp. 65-77
- Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison MJ (2003) Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell Online* 15:2106-2123
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal* 50:529-544

- Liu Z, Peng J, Mo R, Hui C-c, Huang C-H (2001) Rh type b glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 276:1424-1433
- Lomnitz A, Calderón J, Hernández G, Mora J (1987) Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* 133:2333-2340
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287
- López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2006) GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43:102-110
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P, Bouwmeester H (2008) Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* 178:863-874
- López-Ráez JA, Pozo MJ, García-Garrido JM (2011) Strigolactones: A cry for help in the rhizosphere. *Botany* 89:513-522
- López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ (2010) Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany* 61:2589-2601
- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, von Wirén N, Frommer WB (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* 446:195-198
- Loqué D, von Wirén N (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 55:1293-1305
- Lorenz MC, Heitman J (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 17:1236-1247
- Lorillou S, Botton B, Martin F (1996) Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP-glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 132:289-296
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A (2008) A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 180:343-364
- Ludewig U, Neuhäuser B, Dynowski M (2007) Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *Febs Letters* 581:2301-2308

- Ludewig U, von Wiren N, Frommer WB (2002) Uniport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *Journal of Biological Chemistry* 277:13548-13555
- Ludewig U, von Wiren N, Rentsch D, Frommer W (2001) Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? *Genome Biology* 2:1-5
- Ludewig U, Wilken S, Wu B, Jost W, Obrdlik P, El Bakkoury M, Marini A-M, André B, Hamacher T, Boles E, von Wirén N, Frommer WB (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 uniporters. *Journal of Biological Chemistry* 278:45603-45610
- Lumini E, Bianciotto V, Jargeat P, Novero M, Salvioli A, Faccio A, Bécard G, Bonfante P (2007) Presymbiotic growth and sporal morphology are affected in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* cured of its endobacteria. *Cellular Microbiology* 9:1716-1729
- Maathuis FJ (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12:250-258
- MacDonald RM, Chandler MR, Mosse B (1982) The occurrence of bacterium-like organelles in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 90:659-663
- Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296:1694-1697
- Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hijikata A, Okusako Y, Deguchi Y, Izui K, Hata S (2006) Knockdown of an Arbuscular Mycorrhiza-inducible Phosphate Transporter Gene of *Lotus japonicus* Suppresses Mutualistic Symbiosis. *Plant and Cell Physiology* 47:807-817
- Magasanik B (2003) Ammonia Assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 2:827-829
- Magasanik, B. 1996. Regulation of nitrogen utilization,. In: Curtiss III R, Ingrahan JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds.) Neidhardt FC et al. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimuri*: cellular and molecular biology, Vol. 1. ASM Press, Washington DC, pp. 1344-1356
- Magasanik B, Kaiser CA (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1-18
- Maherali H, Klironomos JN (2007) Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316:1746-1748
- Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Becard G, Denarie J (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58-63
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:1140-1148

- Manickavelu A, Kambara K, Mishina K, Koba T (2007) An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54:254-258
- Marini AM, Springael JY, Frommer WB, André B (2000b) Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Molecular Microbiology* 35:378-385
- Marini AM, Matassi G, Raynal V, Andre B, Cartron JP, Chérif-Zahar B (2000a) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genetics* 26:341-344
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 17:4282-4293
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, Andre B (1994) Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 13:3456-3463
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers P, Requena N, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA, Young JPW (2008) The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180:747-750
- Martin F, Tuskan GA, DiFazio SP, Lammers P, Newcombe G, Podila GK (2004) Symbiotic sequencing for the *Populus* mesocosm. *New Phytologist* 161:330-335
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London
- Marzluf GA (1996) Regulation of nitrogen metabolism in mycelial fungi. In: Brambl R, Marzluf GA (eds) *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 357-368
- Marzluf GA (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:17-32
- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanchae* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139:920-934
- Meti RS, Ambarish S, Khajure PV (2011) Enzymes of ammonia assimilation in fungi: an overview. *Recent Research in Science and Technology* 2:28-38
- Miller AJ, Cramer MD (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274:1-36
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD (1995) External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103:17-23
- Miller SM, Magasanik B (1990) Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 172:4927-4935
- Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant Journal* 2:417-422

- Mitchell AP, Magasanik B (1984) Regulation of glutamine-repressible gene products by the Gln3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 4:2758-2766
- Mitsuzawa H (2006) Ammonium transporter genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: role in ammonium uptake and a morphological transition. *Genes to Cells* 11:1183-1195
- Miyara I, Shafran H, Davidzon M, Sherman A, Prusky D (2010) pH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:304-316.
- Monahan BJ, Askin MC, Hynes MJ, Davis MA (2006) Differential expression of *Aspergillus nidulans* ammonium permease genes is regulated by GATA transcription factor AreA. *Eukaryotic Cell* 5:226-237.
- Monahan BJ, Fraser JA, Hynes MJ, Davis MA (2002) Isolation and characterization of two ammonium permease genes, *meaA* and *mepA*, from *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 1:85-94
- Montanini B, Moretto N, Soragni E, Percudani R, Ottonello S (2002) A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genetics and Biology* 36:22-34
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* 18:1-12
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4326
- Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, Boron WF (2009) Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5406-5411
- Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M (2009) Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *New Phytologist* 181:950-959
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht MB, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal* 42:236-250
- Nakhoul NL, Hering-Smith KS, Abdunour-Nakhoul SM, Hamm LL (2001) Transport of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in oocytes expressing aquaporin-1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 281:F255-F263
- Naumann M, Schüßler A, Bonfante P (2010) The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the *Mollicutes*. *ISME Journal* 4:862-871

- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB (1994) Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. *The EMBO journal* 13:3464-3471
- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P (2010) HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell Online* 22:3130-3141
- Ohtomo R, Saito M (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 167:571-578
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44:195-207
- Oldroyd GE, Downie JA (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 9:351-357
- Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U (2009) Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324:753-754
- Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H (2002) Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology* 130:1162-1171
- Ortiz-Ramirez C, Mora SI, Trejo J, Pantoja O (2011) PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as  $\text{H}^+/\text{NH}_4^+$  symporter. *Journal of Biological Chemistry* 286:31113-31122
- Owen AG, Jones DL (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry* 33:651-657
- Özcan S, Leong T, Johnston M (1996) Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Molecular and Cellular Biology* 16:6419-6426
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C (2006) The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* 57:547-557
- Park KH, Lee CY, Son HJ (2009) Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology* 49:222-228
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6:763-775

- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13324-13329.
- Pawlowska TE, Taylor JW (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427:733-737
- Pearson V, Read DJ (1975) The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Transactions of the British Mycological Society* 64:1-7
- Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Villalba JM, Losada M, Serrano A (2002) Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:15914-15919
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2011) *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48:1044-1055
- Pfeffer PE, Douds DD, Becard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120:587-598
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161.
- Piotrowski JS, Denich T, Klironomos JN, Graham JM, Rillig MC (2004) The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New Phytologist* 164:365-373
- Pirozynski KA, Malloch DW (1975) The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* 6:153-164
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393-398
- Pumplin N, Harrison MJ (2009) Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151:809-819
- Purin S, Morton J (2011) *In situ* analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21:505-514
- Raven JA, Wollenweber B, Handley LL (1992) A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* 121:19-32
- Ravnskov S, Wu Y, Graham JH (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytologist* 157:539-545
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1999) AtAMT1 gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19:143-152
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920-1921

- Reinhardt D (2007) Programming good relations - development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 10:98-105
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11841-11843
- Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocón A (2003) Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* 132 (3):1540-1549
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68:33-40
- Reynolds HL, Hartley AE, Vogelsang KM, Bever JD, Schultz PA (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytologist* 167:869-880
- Rillig MC, Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171:41-53
- Robinson D (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127:635-674
- Rodriguez RL, Tait RC (1983) *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*. Addison Wesley, London
- Rosendahl S, Taylor JW (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Molecular Ecology* 6:821-829
- Rufyikiri G, Kruyts N, Declerck S, Thiry Y, Delvaux B, Dupré Boulois H, Joner E (2005) Uptake, assimilation and translocation of mineral elements in monoxenic cultivation systems. In: Declerck S, Fortin JA, Strullu DG (eds) *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 201-215.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes?. *New Phytologist* 171:693-698
- Russell PJ, Rodland KD, Rachlin EM, McCloskey JA (1987) Differential DNA methylation during the vegetative life cycle of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 169:2902-2905
- Rutherford JC, Lin XR, Nielsen K, Heitman J (2008) Amt2 permease is required to induce ammonium-responsive invasive growth and mating in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 7:237-246.
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, López-Ráez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F, Bouwmeester H (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: Another belowground role for strigolactones?. *Plant Physiology* 155:721-734



- Ruzicka DR, Hausmann NT, Barrios-Masias FH, Jackson LE, Schachtman DP (2012) Transcriptomic and metabolic responses of mycorrhizal roots to nitrogen patches under field conditions. *Plant and Soil* 350:145-162
- Ryan MH, McCully ME, Huang CX (2003) Location and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. *New Phytologist* 160:429-441
- Salvemini F, Marini A-M, Riccio A, Patriarca EJ, Chiurazzi M (2001) Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. *Gene* 270:237-243.
- Santos JC, Finlay RD, Tehler A (2006) Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* 172:159-168
- Sawers RJH, Yang S-Y, Gutjahr C, Paszkowsky U (2008) The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interactions. In: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds) *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer, Heidelberg, pp. 37–59
- Schaarschmidt S, González M-C, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B (2007a) Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology* 143:1827-1840
- Schaarschmidt S, Hause B (2008) Apoplastic invertases: Multi-faced players in the arbuscular mycorrhization. *Plant Signaling & Behavior* 3 (5):317-319
- Schaarschmidt S, Kopka J, Ludwig-Müller J, Hause B (2007b) Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *The Plant Journal* 51:390-405
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* 57:4015-4023
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* 136:2483-2499
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3:1101-1108
- Schüßler A (2000) *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10:15-21
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421

- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* 108:7-15
- Shelden MC, Dong B, de Bruxelles GL, Trevaskis B, Whelan J, Ryan PR, Howitt SM, Udvardi MK (2001) *Arabidopsis* ammonium transporters, AtAMT1;1 and AtAMT1;2, have different biochemical properties and functional roles. *Plant and Soil* 231:151-160
- Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, deWit PJGM, Bonfante P (2007) Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* 144:1455-1466
- Simon-Rosin U, Wood C, Udvardi MK (2003) Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 51:99-108
- Smith DG, Garcia-Pedrajas MD, Gold SE, Perlin MH (2003) Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Molecular Microbiology* 50:259-275
- Smith SE, Read, DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK.
- Smith FA, Smith SE (1997) Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137 (3):373-388
- Smith SE (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist* 65 (4):488-499
- Smith SE, Dickson S, Smith FA (2001) Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: How are fungal and plant processes integrated? *Functional Plant Biology* 28:683-694
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39 (1):221-244
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* 156:1050-1057
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62:227-250
- Smith SE, Smith FA (2012) Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104:1-13
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162:511-524

- Smith SE, St John BJ, Smith FA, Nicholas DJD (1985) Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytologist* 99:211-227
- Solaiman MZ, Saito M (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* 136:533-538
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 6:175-182
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wirén N, Yamaya T, Yamaguchi J (2003) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44:726-734
- Soupeine E, King N, Feild E, Liu P, Niyogi KK, Huang CH, Kustu S (2002) Rhesus expression in a green alga is regulated by CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7769-7773
- Sprent JI, James EK (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144:575-581
- Spyropoulos IC, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2004) TMRPres2D: High quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* 20:3258-3260
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* 100:328-332
- St-John BJ, Smith SE, Nicholas DJD, Smith FA (1985) Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella ericae* Read. *New Phytologist* 100:579-584
- Staddon PL, Ramsey CB, Ostle N, Ineson P, Fitter AH (2003) Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of <sup>14</sup>C. *Science* 300:1138-1140
- Stanbrough M, Rowen DW, Magasanik B (1995) Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:9450-9454
- Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2:178-186
- Strack D, Fester T (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist* 172:22-34
- Sturm A, Tang G-Q (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4:401-407

- Suárez MF, Avila C, Gallardo F, Cantón FR, García-Gutiérrez A, Claros MG, Cánovas FM (2002) Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of Experimental Botany* 53:891-904
- Subramanian KS, Charest C (1998) Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum* 102:285-296
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wirén N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T (2003) Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44:206-211
- Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T (2007) Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 58:2319-2327.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011a) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739
- Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, Watanabe H, Tabuchi M, Hayakawa T, Yamaya T (2011b) Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Frontiers in Plant Science* 2.
- Tanaka Y, Yano K (2005) Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell & Environment* 28:1247-1254
- Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Kuga Y, Ezawa T (2009) ATP-dependent but proton gradient-independent polyphosphate-synthesizing activity in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7044-7050
- Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112
- Teichert S, Rutherford JC, Wottawa M, Heitman J, Tudzynski B (2008) Impact of ammonium permeases MepA, MepB, and MepC on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell* 7:187-201
- ter Schure EG, Van Riel NAW, Verrips CT (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 24:67-83
- Thomas G, Coutts G, Merrick M (2000) The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. *Trends in Genetics* 16:11-14
- Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y (2010) Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology* 153:1175-1187
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U,

- Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JPW, Gianinazzi-Pearson V, Martin F (2012) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193:755-769
- Tobar R, Azcón R, Barea JM (1994) Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* 126:119-122
- Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C (2004) Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* 50:251-260
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354
- Trepp GB, Plank DW, Stephen Gantt J, Vance CP (1999) NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localization. *Plant Physiology* 119:829-838.
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8:203-206
- Uetake Y, Kojima T, Ezawa T, Saito M (2002) Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 154:761-768
- Ullrich WR, Larsson M, Larsson CM, Lesch S, Novacky A (1984) Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum* 61:369-376
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455:195-200
- Valenzuela L, Guzman-León S, Coria R, Ramírez J, Aranda C, González A (1995) A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the petit-negative yeast *Kluyveromyces lactis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis. *Microbiology* 141:2443-2447
- Vandenkoornhuyse P, Leyval C, Bonnin I (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87:243-253
- Veresoglou SD, Chen B, Rillig MC (2012) Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry* 46:53-62.
- Versaw WK, Chiou TJ, Harrison MJ (2002) Phosphate transporters of *Medicago truncatula* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244:239-245

- Villegas J, Williams RD, Nantais L, Archambault J, Fortin JA (1996) Effects of N source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system. *Mycorrhiza* 6:247-251
- Voets L, de la Providencia IE, Declerck S (2006) Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist* 172:185-188
- von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB (2000a) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology* 3:254-261
- von Wirén N, Gojon A, Chaillou S, Raper D (2001) Mechanisms and regulation of ammonium uptake in higher plants. In: Lea PJ and Morot-Gaudry JF (eds) *Plant Nitrogen*. Springer, Heidelberg, pp. 61-77
- von Wirén N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB (2000b) Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant Journal* 21:167-175
- von Wirén N, Merrick M (2004) Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. *Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport* 9:95-120
- Walter MH, Floß DS, Hans J, Fester T, Strack D (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: Contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68 (1):130-138
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299-363
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM (1993) Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103:1259-1267
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell* 12:1491-1509. doi:10.1105/tpc.12.8.1491
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1.000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* 132:556-567
- Wang Y-H, Garvin DF, Kochian LV (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology* 127:345-359
- Weidinger K, Neuhäuser B, Gilch S, Ludewig U, Meyer O, Schmidt I (2007) Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiology Letters* 273 (2):260-267
- Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant

- genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:1385-1393
- Wiame JM, Grenson M, Ars Jr HN (1985) Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbial Physiology* 26:1-88
- Williams L, Miller A (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:659-688.
- Wong KH, Hynes MJ, Davis MA (2008) Recent advances in nitrogen regulation: A comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 7:917-925
- Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* 21:881-891
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2005) European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 167:881-896
- Xu G, Chague V, Melamed-Bessudo C, Kapulnik Y, Jain A, Raghothama KG, Levy AA, Silber A (2007) Functional characterization of LePT4: a phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany* 58:2491-2501
- Yao Q, Ohtomo R, Saito M (2010) Influence of nitrogen and phosphorus on polyphosphate accumulation in *Gigaspora margarita* during spore germination. *Plant and Soil* 330:303-311
- You M, Nishiguchi T, Saito A, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2005) Expression of the *nifH* gene of a herbaspirillum endophyte in wild rice species: daily rhythm during the light-dark cycle. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8183-8190
- Yu TE, Egger KN, Peterson LR (2001) Ectendomycorrhizal associations - Characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11:167-177
- Zeze A, Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1996) Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in planta. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2443-2448
- Zhang H, Rong H, Pilbeam D (2007) Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58:2329-2338
- Zhao X-Q, Shi W-M (2006) Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Science* 170:748-754
- Zhu J, Zhang MQ (1999) SCPD: A promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* 15:607-611
- Zocco D, Van Aarle I, Oger E, Lanfranco L, Declerck S (2011) Fenpropimorph and fenhexamid impact phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21:363-374





