



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EVALUACIÓN DE LA ENDOCITOSIS DE *PvSYMRK* EN PELOS RADICALES DE
FRIJOL EN RESPUESTA A LA INCUBACIÓN CON RHIZOBIA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. RAÚL DÁVILA DELGADO

TUTOR PRINCIPAL

Dra. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ
Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Felipe Cruz García, Facultad de Química-UNAM
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, Instituto de Biotecnología-UNAM

Cuernavaca. Abril, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DÁVILA DELGADO RAÚL
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **3 de diciembre de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Evaluación de la endocitosis de PvSYMRK en pelos radicales de frijol en respuesta a la incubación con Rhizobia.**", dirigida por el/la Dr(a). **SÁNCHEZ LÓPEZ ROSANA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PORTA DUCOING HELENA	PMDCBQ	PRESIDENTE
FORMEY DE SAINT LOUVENT DAMIEN	PMDCBQ	SECRETARIO
DIAZ CAMINO CLAUDIA	PMDCBQ	VOCAL
GAVILANES-RUIZ RUÍZ MARINA	PMDCBQ	VOCAL
SERRANO ORTEGA MARIO	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 9 de enero de 2024



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“EVALUACIÓN DE LA ENDOCITOSIS DE PvsYMRK EN PELOS RADICALES DE FRUJOL EN RESPUESTA A LA INCUBACIÓN CON RHIZOBIA”

que presenté para obtener el grado de ----Doctorado----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raúl Dávila Delgado'.

M.C. Raúl Dávila Delgado
51001555-0

Dedicatoria:

A mi amada familia: mamá Eva, hermana Nalu, mami Estela y papi Hipolito por su amor, paciencia y apoyo todos los días de mi vida.

A Rosana por siempre creer y confiar en mi y guiarme hasta este punto.

A mis queridos amigos por sus consejos, su presencia en los momentos difíciles y su disponibilidad para estar en las buenas y las malas.

Reconocimientos:

Este trabajo se realizó en el grupo de la Dra. Rosana Sánchez López, investigadora del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM (IBt-UNAM).

Reconocimiento especial al apoyo para la realización del proyecto: beca **CONAHCyT** nivel doctorado 288601 y apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM (PAPIIT/UNAM IN207215, IN206118 e IN204721) y al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), por las facilidades otorgadas para la participación en un congreso nacional y otro internacional.

Agradecimientos especiales:

Mi agradecimiento al M.C. Andrés M. Saralegui Amaro y Dr. J. Arturo Pimentel Cabrera miembros del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBt-UNAM, por su excelente asistencia técnica en microscopía confocal.

Al M.C. Eugenio López Bustos, M.C. Jorge Arturo Yañez Ponce de León y Dr. Rubén Paul Gaytán Colin por los servicios en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, IBt-UNAM.

También agradezco a Shirley E. Ainsworth por los servicios bibliotecarios (Unidad de Biblioteca, IBt-UNAM), M.T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, Ing. Roberto P. Rodríguez Bahena, L.I Jesús Omar Arriaga Pérez y M.C. Arturo Ocádiz Ramírez por los servicios informáticos (Unidad de Cómputo, IBt-UNAM).

La cepa de *R. etli* CFNX89 fue amablemente proporcionada por el Dr. David Romero y Laura Cervantes de la Luz, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM y el plásmido mTurquoise2 fue atentamente proporcionado por el Dr. Takuya Nishigaki Shimizu (IBt-UNAM), a quienes agradezco sinceramente.

Agradezco al Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas por su asesoría técnica en el procesamiento de imágenes y al Dr. Enrique Merino Pérez (IBt- UNAM) por la lectura crítica del manuscrito Dávila-Delgado *et al.*, 2023. La participación de Noreide Nava Núñez y Oliva Santana Estrada (IBt-UNAM) en la etapa inicial de este proyecto también se agradece.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Abreviaturas.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	
1.1 Interacción simbiótica leguminosa-rhizobia	4
1.2 Generalidades de endocitosis	6
1.2.1 Endocitosis en plantas	8
1.2.2 Ejemplos de receptores endocitados en plantas	8
1.2.3 Herramientas en el estudio de endocitosis	9
1.2.4 Endocitosis en pelos radicales	10
1.2.5 Endocitosis en pelos radicales de frijol.....	12
2.- ANTECEDENTES	
2.1 El receptor tipo cinasa SYMRK	13
2.1.1 La participación de SYMRK en la simbiosis leguminosa:rhizobia	14
2.1.2 PvSymRK en <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
2.1.3 SYMRK en pelos radicales y evidencias de su posible endocitosis	21
2.2 Planteamiento de la pregunta.....	22
3.- HIPÓTESIS.....	24
4.- OBJETIVO	25
4.1 Objetivos particulares.....	25
5.- METODOLOGÍA	
5.1 Germinación de semillas de frijol variedad Negro Jamapa	26
5.2 Preparación de rhizobia e inoculación de plantas.....	26
5.3 Montaje de plántulas en caja Petri.....	26
5.4 Agroinfiltración de hojas de tabaco.....	27

5.5	Observación de hojas de tabaco agroinfiltradas	28
5.6	Construcciones de plásmidos.....	28
5.7	Amplificación por PCR	29
5.8	Método de amplificación por PCR a partir de colonia bacteriana.....	31
5.9	Digestión enzimática con enzimas de restricción	31
5.10	Ligación de fragmentos de DNA.....	31
5.11	Sistema de clonación por recombinación	32
5.12	Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i>	32
5.13	Generación de raíces transgénicas de frijol.....	32
5.14	Mutagénesis sitio dirigida	33
5.15	Visualización <i>in vivo</i> y tratamiento de pelos radicales con sondas fluorescentes e inhibidores.....	34
5.16	Captura de imágenes.....	34
5.17	Procesamiento de imágenes y evaluación cuantitativa de estructuras punteadas en células epidermales y pelos radicales	35
5.18	Análisis estadístico.....	35
6.- RESULTADOS		
6.1	Análisis de la expresión de las proteínas quiméricas fluorescentes PvSYMRK-EGFP y LifeActTurquoise2 en raíces transgénicas de frijo	36
6.2	Efecto de inhibidores de tráfico vesicular sobre la distribución de PvSYMRK-EGFP en células epidermales tipo " <i>nonhair</i> " de raíces transgénicas.....	39
6.3	Efecto de las mutaciones T589A, K618E y Δ YKTL en la endocitosis de PvSYMRK-EGFP	49
6.4	Endocitosis de PvSYMRK-EGFP en pelos radicales de <i>P. vulgaris</i> en respuesta a la inoculación con rizobia.....	53
7.- DISCUSIÓN		57
8.- CONCLUSIONES		64
9.- PERSPECTIVAS.....		65

10.- LITERATURA CITADA..... 66

11.- ANEXOS

ANEXO 1	85
11.1 Generación de la construcción pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP con marcador de selección LifeAct-Turquoise2.....	85
11.1.1 Generación de la construcción 35S::LifeAct-Turquoise2	85
11.1.2 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2 en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> agroinfiltradas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
11.1.3 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2 en raíces transgénicas de frijol	91
11.1.4 Clonación de pPvSYMRK::PvSYMRK en pK2GW7-LifeAct-Turquoise.....	93
ANEXO 2	99
11.2 Análisis de pelos radicales de frijol incubados con FM4@64.....	99
11.2.1 Efecto de inhibidores de tráfico vesicular sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol	102
ANEXO 3 Raúl Dávila-Delgado, María Fernanda Gómez-Méndez, Rosario Vera-Estrella, Rosana Sánchez-López. 2019. Endocitosis en plantas (parte 1): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas. <i>Revista de Educación Bioquímica (REB)</i> , 38(1):14-22	107
ANEXO 4 María Fernanda Gómez-Méndez, Raúl Dávila-Delgado, Rosana Sánchez-López, Rosario Vera-Estrella. 2019. La endocitosis en plantas (parte 2): cómo estudiarla utilizando inhibidores. <i>Revista de Educación Bioquímica (REB)</i> , 38(2):38-47	116
ANEXO 5 Dávila-Delgado, R., Bañuelos-Vázquez, L.A., Monroy-Morales, E., Sánchez-López, R. 2020. <i>Rhizobium etli</i> CE3-DsRed pMP604: a useful biological tool to study initial infection steps in <i>Phaseolus vulgaris</i> nodulation. <i>Planta</i> , 252, 69.....	126

ANEXO 6 Dávila-Delgado, R., Flores-Canúl K, Juárez-Verdayes MA, Sánchez-López, R. 2023. Rhizobia induce SYMRK endocytosis in *Phaseolus vulgaris* root hair cells. *Planta*, 257:83 132

ANEXO 7 Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-deBuen, A., & Sánchez-López, R. 2022. Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 5267..... 147

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1 Proceso de nodulación	4
Fig. 2 Actividad del promotor <i>PvSYMRK</i> en raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> no inoculadas e inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 GUS	16
Fig. 3 Esquema de la estructura primaria de SYMRK y mapeo de mutaciones que confieren un fenotipo nod- en otras leguminosas, o deficiencias en fosforilación <i>in vitro</i>	20
Fig. 4 Imágenes de microscopía confocal de disco giratorio <i>in vivo</i> representativas de la epidermis de la raíz y de pelos radicales transgénicos de <i>P. vulgaris</i> , que portan el cassette p <i>PvSYMRK::PvSYMRK-p35S::LifeAct-mTurquoise2</i>	37
Fig. 5 Evaluación cuantitativa del número de estructuras punteadas marcadas con <i>PvSYMRK-EGFP</i>	38
Fig. 6 Imágenes representativas de la cinética de incubación con el inhibidor BFA (100 μ M) en células de la epidermis de raíces transgénicas que expresan <i>PvSYMRK-EGFP</i>	39
Fig. 7 <i>PvSYMRK-EGFP</i> se acumula en compartimentos inducidos por BFA	41
Fig. 8 La densidad de puncta que contienen <i>PvSYMRK-EGFP</i> se reduce en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis IKA 20 μ M	43
Fig. 9 La densidad de puncta que contienen <i>PvSYMRK-EGFP</i> disminuye en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis TyrA23 50 μ M	44
Fig. 10 La densidad de puncta que contienen <i>PvSYMRK-EGFP</i> no cambia en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis Tyr51 50 μ M	46
Fig. 11 La densidad de puncta que contienen <i>PvSYMRK-EGFP</i> se reduce en células epidermales tratadas con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHX 50 μ M	47
Fig. 12 La señal de <i>PvSYMRK-EGFP</i> en la membrana plasmática de células epidermales tipo " <i>nonhair</i> " no se ve afectada por el tratamiento con inhibidores de endocitosis, tráfico vesicular y síntesis de proteínas	48
Fig. 13 Representación de p <i>PvSYMRK::PvSYMRK-EGFP</i> y alineamiento de fragmento de secuencias	50
Fig. 14 Las mutaciones T589A, K618E y Δ YKTL afectan la endocitosis constitutiva de <i>PvSYMRK-EGFP</i>	52
Fig. 15 La endocitosis de <i>PvSYMRK-EGFP</i> se induce en los pelos radicales de <i>P. vulgaris</i> que responden a la inoculación de <i>R. etli</i>	55
Fig. 16 Esquema del vector de expresión pH7FWG2-p <i>PvSYMRK::PvSYMRK-EGFP</i>	85
Fig. 17 Esquema de la quimera LifeAct-Turquoise2	86

Fig. 18 Amplificación de LifeAct-Turquoise2 por PCR	87
Fig. 19 Análisis por PCR en colonia de la clonación del fragmento LifeAct-Turquoise2 en pENTR™/D TOPO®	87
Fig. 20 Confirmación de identidad de las clonas pENTR-LifeAct-Turquoise2.6 y pENTR-LifeAct-Turquoise2.8.....	88
Fig. 21 Representación <i>in silico</i> de las construcciones pENTR-LifeAct-Turquoise2 y pK2FGW7-LifeAct-Turquoise2.....	88
Fig. 22 Análisis de la construcción pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.....	89
Fig. 23 Análisis por PCR en colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GB1301 transformada con la construcción pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8, usando oligonucleótidos LifeAct LUP y mCherry LW	90
Fig. 24 Análisis por microscopía de epifluorescencia de células de pavimento de hojas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con <i>A. tumefaciens</i> transformada con pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8.....	91
Fig. 25 Análisis por PCR en colonias de <i>A. rhizogenes</i> cepa K599 transformada con la construcción pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8, usando los oligonucleótidos LifeAct LUP y mCherry LW.....	91
Fig. 26 Análisis por estereomicroscopía de epifluorescencia de raíces pilosas de frijol transformadas con clonas de <i>A. rhizogenes</i> K599 que portan pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8.....	92
Fig. 27 Análisis por microscopía <i>in vivo</i> de epifluorescencia de pelos radicales transgénicos de <i>P. vulgaris</i> , que expresan LifeAct-Turquoise2	93
Fig. 28 Etapas de amplificación y clonación de pPvSYMRK::PvSYMRK en pENTR.....	94
Fig. 29 Representación <i>in silico</i> de la construcción pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3.....	95
Fig. 30 Etapas de recombinación de MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma en el vector de expresión en plantas pK2GW7	95
Fig. 31 Etapas de amplificación y análisis de MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35SSac en pENTR.....	96
Fig. 32 Etapas de clonación y análisis de la construcción pK2GW7-PvSYMRK-LifeActTurquoise2.....	97
Fig. 33 Representación <i>in silico</i> de la construcción pK2GW7-PvSYMRK-LifeActTurquoise2.....	98
Fig. 34 Visualización de pelos radicales de frijol incubados con FM4@64.....	100

Fig. 35 Cinética de internalización de FM4@64.....	101
Fig. 36 Plasmólisis suave en pelos radicales marcados con FM4@64	102
Fig. 37 Imágenes representativas del efecto de BFA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol de 48 hpg.....	103
Fig. 38 Gráfica representativa del efecto de BFA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol	104
Fig. 39 Imágenes representativas del efecto de IKA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol de 48 hpg.....	105
Fig. 40 Gráfica representativa del efecto de IKA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol	106
Tabla 1. Nomenclatura de SYMRK y ortólogos.....	13
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para generar y analizar las construcciones	29
Tabla 3. Espectros de excitación y emisión de sondas fluorescentes a utilizar en este trabajo.....	86

Abreviaturas

Factores Nod	Factores de nodulación
hpi	Horas <i>post</i> -inoculación
dpi	Días <i>post</i> -inoculación
IT	Siglas en inglés de <i>Infection thread</i> , Hilo de infección
CME	Siglas en inglés de <i>clathrin mediated endocytosis</i> , endocitosis mediada por clatrina
CCV	Siglas en inglés de <i>clathrin coated vesicles</i> , vesículas cubiertas de clatrina
CLC	Cadenas ligera de clatrina
CHC	Cadenas pesada de clatrina
ARF	Siglas en inglés de <i>adenosyl ribosylation factor</i> , factor de ribosilación de adenosilo
MVBs	Siglas en inglés de <i>multivesicular bodies</i> , cuerpos multivesiculares
TGN	<i>trans</i> -Golgi network, red <i>trans</i> del Golgi
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
FLS2	FLAGELLIN SENSING 2
IKA	Ikarugamicina
BFA	Brefeldina A
CHX	Cicloheximida
TyrA23	Tirfostina A23
Tyr51	Tirfostina 51
KD	Siglas en inglés de <i>Kinase-dead</i> , cinasa muerta o inactiva
RLK	Siglas en inglés de <i>Receptor-like kinase</i> , receptor tipo cinasa
SYMRK	Siglas en inglés de <i>Symbiosis receptor-like kinase</i> , receptor simbiótico tipo cinasa
MLD	Dominio tipo malectina
GFP	Siglas en inglés de <i>green fluorescence protein</i> , proteína verde fluorescente
GUS	Enzima β -glucuronidasa
YXMi	Yuxtamembranal intracelular
SEM	Siglas en inglés de <i>standar error media</i> , error estándar de la media

RESUMEN

La interacción simbiótica entre leguminosas y bacterias del suelo, llamadas colectivamente rhizobia, es un proceso complejo que inicia a través de una comunicación química mediada por la activación de la síntesis y secreción de factores Nod de origen rhizobial y su percepción a través de receptores tipo LysM específicos presentes en la membrana plasmática apical del pelo radical. En respuesta, el receptor tipo cinasa SYMRK/DMI2, se activa y desencadena una cascada de señalización que induce mecanismos genéticos, moleculares y celulares esenciales para la infección con rhizobia y la organogénesis del nódulo. La identificación de proteínas tipo ubiquitina-ligasas E3, como posibles interactores de SYMRK, sugiere la participación de mecanismos celulares de regulación de la actividad de SYMRK. En esta tesis se demostró que, en células epidermales de raíz de *Phaseolus vulgaris* no inoculadas con rhizobia, PvSYMRK-EGFP presenta una distribución subcelular dual, asociada a la membrana plasmática y en *puncta* intracelulares. El tratamiento con inhibidores de endocitosis mediada por clatrina, IKA o TyrA23, o de tráfico vesicular, BFA, así como las mutaciones T589A (no fosforilable), K618E (cinasa inactiva) o la eliminación del motivo YKTL (motivo endocítico tipo YXXØ) conlleva a una drástica reducción en el número de *puncta* intracelulares fluorescentes, lo que indica que PvSYMRK-EGFP lleva a cabo endocitosis constitutiva. Al analizar raíces transgénicas de *P. vulgaris* *post*-inoculadas (3 dpi) con *Rhizobium etli* CE3 pMP604 (cepa que produce factores Nod de manera constitutiva), se encontró que PvSYMRK-EGFP desaparece de la membrana plasmática apical de aquellos pelos radicales cuya zona apical presenta un patrón típico de la respuesta a rhizobia (lo que se deduce por la acumulación de filamentos de actina fragmentados en la zona apical). También se observó un incremento significativo en el número de *puncta* intracelulares que portan PvSYMRK-EGFP. En contraste, en los pelos radicales de *P. vulgaris* que responden a la inoculación con *R. etli* CE3 CFNX89 (cepa incapaz de sintetizar factores Nod), la distribución subcelular es similar a la observada en raíces no inoculadas, lo que demuestra que rhizobia induce la endocitosis de PvSYMRK-EGFP mediante un mecanismo dependiente de los factores Nod. Para la endocitosis inducida, también se requiere del motivo YKTL y de la actividad cinasa del receptor. En resumen, las células epidermales de raíces de *P. vulgaris*, *pre*- y *post*-inoculadas con una cepa de *R. etli* que produce factores Nod, presentan endocitosis de PvSYMRK-EGFP, constitutiva e inducida por rhizobia, respectivamente.

ABSTRACT

The symbiotic interaction between legumes and soil bacteria, collectively called rhizobia, is a complex process that begins through a chemical communication mediated by the synthesis *de novo* and secretion of Nod factors of rhizobial origin and their perception through specific LysM receptors-like kinase present in the apical plasma membrane of the root hair. Consequently, the receptor-like kinase SYMRK/DMI2 becomes activated and triggers a signaling cascade that induces genetic, molecular, and cellular mechanisms essential for rhizobial infection and nodule organogenesis. The identification of E3 ubiquitin protein ligases, as potential SYMRK interactors, suggests the involvement of cellular mechanisms regulating SYMRK activity. In this thesis, it was demonstrated that in root epidermal cells of *Phaseolus vulgaris* not inoculated with rhizobia, PvSYMRK-EGFP presents a dual subcellular distribution, associated with the plasma membrane and with intracellular puncta. Treatment with the inhibitors of clathrin-mediated endocytosis, IKA or TyrA23, and vesicular trafficking, BFA, as well as the mutations T589A (non-phosphorylatable), K618E (kinase dead) and deletion of the YKTL motif (YXXØ-type endocytic motif) lead to a drastic reduction in the number of intracellular fluorescent puncta, indicating that PvSYMRK-EGFP undergoes constitutive endocytosis. The analysis of *P. vulgaris* transgenic roots *post*-inoculated (3 dpi) with *Rhizobium etli* CE3 pMP604 (a strain that constitutively produces Nod factors) showed that PvSYMRK-EGFP disappears from the apical plasma membrane of those root hairs whose apical zone present a typical rhizobia-responsive pattern (accumulation of fragmented actin filaments). A significant increase in the number of intracellular puncta carrying PvSYMRK-EGFP was also observed. In contrast, in *P. vulgaris* root hairs that respond to *R. etli* CE3 CFNX89 (a strain incapable of synthesizing Nod factors) inoculation, the subcellular distribution of PvSYMRK-EGFP is like to that observed in non-inoculated roots, demonstrating that rhizobia induce PvSYMRK-EGFP endocytosis through a Nod factor-dependent mechanism. Such an induced endocytosis also requires the YKTL motif and the receptor kinase activity. In summary, epidermal cells from *P. vulgaris* roots, pre- and *post*-inoculated with a Nod factor-producing *R. etli* strain, undergo PvSYMRK-EGFP constitutive and rhizobial-induced endocytosis, respectively.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Interacción simbiótica leguminosa-rhizobia

La simbiosis entre plantas leguminosas (como *Phaseolus vulgaris* o frijol común, *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, entre otras) y bacterias del suelo, genéricamente conocidas como rhizobia (géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, entre otros), conduce al desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la planta, el nódulo fijador de nitrógeno. En este tipo de simbiosis, las bacterias aportan a la leguminosa una fuente de nitrógeno biológicamente asimilable y, a cambio, la leguminosa cede a las bacterias esqueletos de carbono para sus funciones vitales. La interacción leguminosa-rhizobia es especie-específica e inicia cuando la bacteria endosimbionte compatible con la leguminosa en cuestión (*R. etli* y *R. tropici*, en el caso de *P. vulgaris*) reconoce compuestos tipo flavonoides, especie-específicos, liberados por la raíz de la leguminosa a la rizósfera (Fig.1; Oldroyd, 2013, Liu *et al.*, 2018). Este reconocimiento está mediado por la proteína bacteriana transmembranal NodD, responsable de la activación de los genes bacterianos involucrados en la síntesis y secreción de metabolitos tipo lipooligosacáridos, llamados factores de nodulación (factores Nod; Cullimore *et al.*, 2001).

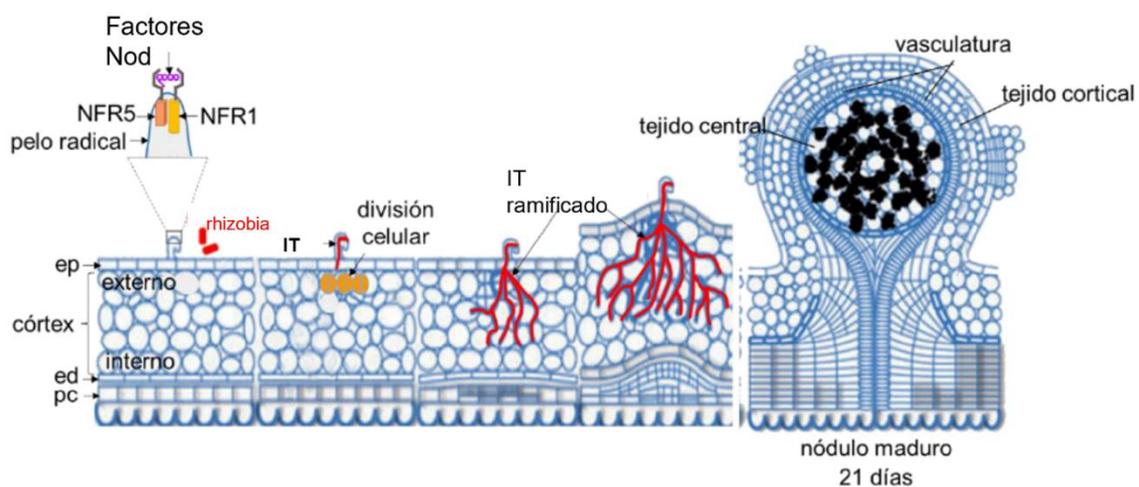


Figura 1. Proceso de nodulación. Los factores Nod son percibidos por receptores específicos (*Lj*NFR1/NFR5), presentes en la membrana plasmática de los pelos radicales de la raíz, lo que promueve cambios morfológicos y fisiológicos en el pelo radical. Cuando

rhizobia se adhiere al pelo radical, este en respuesta se enrosca y atrapa a rhizobia en una cámara de infección. En este punto se inicia la formación de un hilo de infección (IT), que se originan por la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical. El IT sigue un crecimiento polar hacia las capas celulares internas, alcanzando el primordio del nódulo, formado por desdiferenciación y por la reactivación de la división celular en el córtex. Los primordios de nódulos dan lugar a nódulos maduros, en los que las bacterias se liberan del IT en simbiosomas y se diferencian para convertirse en bacteroides fijadores de nitrógeno (ilustrados en negro). A los 21 días, en *P. vulgaris*, se ha desarrollado un nódulo maduro. ep, epidermis; ed, endodermis; pc, periciclo. Esquema modificado de Ferguson *et al.*, 2010.

La percepción de los factores Nod por los pelos radicales provoca una serie de respuestas fisiológicas, celulares, moleculares, morfológicas y de expresión génica, que en conjunto desencadenan la infección y organogénesis del nódulo. Entre los cambios inducidos en el ápice del pelo radical en un periodo de 10 s – 2 h *post*-incubación con 10 nM de factores Nod, se ha reportado un influjo de calcio, la despolarización de la membrana, arresto del crecimiento apical, ocurren oscilaciones en la concentración de calcio en la región nuclear y rearrreglos en el citoesqueleto de actina del pelo radical, por citar algunos (Cárdenas *et al.*, 1998, 1999, 2000 y 2006; Oldroyd y Downie, 2008).

En términos generales, a las 12-24 h *post*-inoculación (hpi) con rhizobia, se observa una deformación-curvatura en el ápice del pelo radical sensible (*responsive*, en inglés) a rhizobia, sitio en el que quedan atrapadas las bacterias. En ese punto, la pared celular del pelo sufre modificaciones, la membrana de la célula se invagina y se forma una estructura tubular, transcelular y apoplástica única, conocida como hilo de infección (IT, siglas en inglés de *infection thread*; 48-72 hpi), cuyo lumen es extracelular al pelo radical y avanza en dirección opuesta al crecimiento del pelo radical para, eventualmente, ramificarse hacia las células corticales (Fig. 1, Oldroyd, 2013, Monroy-Morales *et al.*, 2022, Anexo 7). El IT favorece la proliferación de rhizobia y dirige su invasión hacia la zona cortical de la raíz. Antes de que el IT llegue al córtex, las células corticales activan su ciclo celular y se dividen para formar el primordio del nódulo (3-5 dpi). Posteriormente, mediante un mecanismo tipo exocitosis-endocitosis, las bacterias se “vacían” del IT al entorno intracelular de las células del primordio de nódulo y se diferencian a bacteroides dentro de una estructura *quasi*-organelo conocida como simbiosoma (10 dpi). Los bacteroides fijan N₂ y lo convierten a NH₃ mediante un complejo enzimático conocido como

nitrogenasa (Fig. 1). La organogénesis del nódulo está acompañada por la inducción de genes específicos del nódulo denominados nodulinas (Oldroyd y Downie, 2008; Oldroyd, 2013).

El orden en que se suceden dichos cambios respecto a la percepción de los factores Nod por el pelo radical, la expresión génica y las cascadas de transducción de señales que se activan, se han estudiado gracias a la generación y caracterización de leguminosas mutantes deficientes en la iniciación y formación del nódulo (Roy *et al.*, 2020). Esta estrategia ha permitido la identificación de receptores tipo cinasa presentes en la membrana celular, cuya activación inicia cascadas de señalización esenciales para el inicio de la nodulación (Oldroyd, 2013, Roy *et al.*, 2020). Tal es el caso de los receptores tipo LysM conocidos como *LjNFR1/LjNFR5* o *MtNFP/MtLYK3*, involucrados en la percepción de los factores Nod identificados en *Lotus japonicus* y en *Medicago truncatula*, respectivamente (Roy *et al.*, 2020).

Otros ejemplos son SYMRK, un receptor tipo cinasa con dominios repetidos ricos en leucina y tema del presente trabajo, y el receptor de la fitohormona citoquinina en *M. truncatula*, *MtCRE* o su ortólogo en *L. japonicus* *LjLHK1*, que resulta esencial para la división de células corticales en la organogénesis del nódulo. La lista de proteínas identificadas se extiende a proteínas de la envoltura nuclear involucradas en el flujo iónico (*DMI1* en *M. truncatula* y sus ortólogos *POLLUX* y *CASTOR* en *L. japonicus*), receptores tipo cinasa y factores de transcripción que participan en la decodificación de señales asociadas a las oscilaciones de Ca^{2+} (proteína dependiente de calcio-calmodulina o *CCaMK* y *LjCYCLOPS*), factores de transcripción de la familia GRAS (*NSP1* y *NSP2*), *NIN* y *ERN1*, entre otros (Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). Si bien, estos genes no han sido finamente caracterizados en raíces no inoculadas con rhizobia, su expresión en raíces inoculadas sugiere que se han reclutados de programas moleculares propios del desarrollo de la raíz (Oldroyd, 2013; Yang *et al.*, 2022).

1.2. Generalidades de endocitosis

La endocitosis es un proceso esencial y altamente regulado en todas las células eucariotas, por el cual la célula internaliza material extracelular mediante la invaginación de la membrana plasmática y la formación de vesículas endocíticas. Sus principales funciones en la célula son la adquisición de nutrientes, la internalización de complejos (receptor-ligando), la regulación de la transducción de señales y la regulación de la composición de la membrana plasmática (Doherty y McMahon, 2009). Existen varios mecanismos de endocitosis: endocitosis mediada por clatrina (CME, siglas en inglés de *clathrin mediated endocytosis*), la endocitosis mediada por caveolina, macropinocitosis, y endocitosis independiente de dinamina, clatrina y caveolina, entre otros mecanismos (Seto, 2002).

CME, también conocida como endocitosis mediada por receptores de membrana, es a la fecha la mejor caracterizada (Conner y Schmid, 2003; Doherty y McMahon, 2009). Este proceso requiere de la participación de una compleja maquinaria molecular constituida por las cadenas ligera (CLC) y pesada de clatrina (CHC), dinamina, proteínas adaptadoras o AP, Rab GTPasas, ARF (siglas en inglés de *adenosyl ribosylation factor*), proteínas tipo SNARE, SNAP, ROPs y actina, por citar algunos participantes (Sorkin, 2004). Por su composición, estas vesículas se han denominado vesículas cubiertas de clatrina (CCV por siglas en inglés de *clathrin coated vesicles*).

De manera general, la CME implica la sucesión ordenada de varias etapas: selección de material a ser endocitado (moléculas cargo, por ejemplo, receptores), reclutamiento de los componentes de la maquinaria de CME e invaginación de la membrana con material a endocitar, autoensamblaje de las subunidades CLC y CHC para formar la cubierta de la vesícula, y finalmente, la escisión de la vesícula endocítica (Conner y Schmid, 2003; Doherty y McMahon, 2009). Una vez liberada la vesícula, se desensambla la cubierta de clatrina y la vesícula se fusiona al endosoma, en donde las moléculas cargo son segregadas según su destino ya sea al reciclaje a la membrana plasmática, a endosomas intermedios (también conocidos como cuerpos multivesiculares o MVBs, por sus siglas en inglés de *multivesicular bodies*) en ruta hacia degradación en lisosoma (vacuola, en el caso

de células vegetales), o hacia la red *trans* del Golgi o TGN, por sus siglas en inglés *trans Golgi network* (Holstein, 2005; McMahon y Boucrot, 2011).

1.2.1 Endocitosis en plantas

Bajo el argumento sobre la rigidez de la pared celular y la alta presión de turgencia en las células vegetales, se consideró durante años que estas células no realizaban endocitosis. No obstante, el análisis bioinformático del genoma de *Arabidopsis*, aunado al uso de marcadores membranales fluorescentes y la caracterización funcional de receptores de membrana han demostrado la existencia de la maquinaria de CME y, de forma inequívoca, su extraordinaria dinámica (Ueda *et al.*, 2001; Grebe *et al.*, 2003; Geldner *et al.*, 2003; Meckel *et al.*, 2004; Baluska *et al.*, 2004; Tse *et al.*, 2004; Haupt *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2005). En plantas, la endocitosis y los endosomas tienen múltiples funciones, son clave en la diferenciación de embriones (Geldner *et al.*, 2003), el gravitropismo (Silady *et al.*, 2004), la diferenciación de la epidermis (Shen *et al.*, 2003), el movimiento de células guarda (Shope *et al.*, 2003), la remodelación de la pared celular (Baluska *et al.*, 2002), la regulación del transporte de auxinas y de la respuesta de defensa contra patógenos (Robatzek *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007), entre otros procesos. A la fecha, el proceso de CME es el mejor caracterizado en plantas. Al igual que en células animales, en células vegetales la CME requiere de la activa participación del citoesqueleto de actina. La literatura registra algunos datos experimentales que indican actividad endocítica asociada a balsas lipídicas ("*lipid rafts*") o microdominios membranales enriquecidos en esteroides (estigmaesterol y sitoesterol), esfingolípidos y proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidil-inositol) en membranas plasmáticas de tabaco (Mongrand *et al.*, 2004). Para una revisión más detallada sobre la endocitosis en plantas se sugiere revisar el artículo de revisión "*Endocitosis en plantas (parte 1): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas*", escrito durante la realización de este proyecto (Dávila-Delgado *et al.*, 2019, Anexo 3).

1.2.2 Ejemplos de receptores endocitados en plantas

El número de reportes de proteínas de membrana y receptores endocitados en células vegetales ha ido en aumento en los últimos años. Entre los receptores caracterizados se encuentran PIN1 y PIN2 (transportadores de auxina; Ischebeck *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013b; Čovanová *et al.*, 2013), el transportador de boro (Takano *et al.*, 2005; Yoshinari *et al.*, 2012), el canal de potasio KAT1 (Sutter *et al.*, 2007 ; Reuff *et al.*, 2010); el complejo formado por los receptores membranales tipo cinasa BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1; Geldner *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2008; Irani *et al.*, 2012; Di Rubbo *et al.*, 2013) y BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1- Associated Receptor Kinase; Russinova *et al.*, 2004) involucrados en la percepción de la hormona brasinoesteroide (Ingram, 2007); FLS2, un receptor tipo RLK-LRR asociado a la respuesta inmune de la planta, cuyo ligando es la proteína bacteriana flagelina o el flg22 (Robatzek *et al.*, 2006, Beck *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Spallek *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014). Siendo estos dos últimos los mejor caracterizados en términos de complejos receptor-ligando en plantas.

1.2.3 Herramientas en el estudio de endocitosis

Uno de los grandes retos en la actualidad ha sido el desarrollo de herramientas moleculares que permitan la caracterización del proceso endocítico en células vegetales. Entre estas herramientas se encuentran los compuestos que inhiben alguna etapa en el proceso endocítico, por ejemplo: wortmannina, droga que inhibe la actividad de las PI3Ks (fosfoinositol 3 cinasas), bloqueando el tráfico vesicular y el transporte a vacuola en células de la planta (Matsuoka *et al.*, 1995; Di Sebastiano *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2012; Takáč *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013b, Wang *et al.*, 2013c; Smith *et al.*, 2014).

El metabolito fúngico brefeldina A (BFA) es otro compuesto comúnmente utilizado, pues interfiere con el tráfico de vesículas, uniéndose al complejo de la ARF GTPasa y su factor intercambiador del nucleótido guanidina, GNOM, en células vegetales (Jackson y Casanova, 2000; Geldner *et al.*, 2003; Yoshinari *et al.*, 2021). Después de la incubación con BFA, el transportador de auxina PIN1, así como otras proteínas de membrana plasmática, se re-localiza en un amplio compartimento derivado de endosoma, llamado "compartimento inducido por BFA/compartimento BFA"

(Geldner *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2009; Carluccio y Stavolonem, 2014; Ichikawa *et al.*, 2014).

Otra de las herramientas moleculares de gran valor para entender la endocitosis con la que contamos actualmente es tirfostina A23 (inhibidor de tirosinas cinasas), que inhibe la endocitosis y ha sido muy útil en la caracterización de la maquinaria endocítica en plantas (Dhonukshe *et al.*, 2007; Konopka *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Golani *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014). Para una revisión más detallada sobre herramientas utilizadas en el estudio de endocitosis en plantas se sugiere revisar el artículo de revisión *La endocitosis en plantas (parte 2): cómo estudiarla utilizando inhibidores*, escrita en colaboración, durante la realización de este proyecto (Gómez-Méndez *et al.*, 2019, Anexo 4).

El citoesqueleto de actina juega un papel clave en la endocitosis en células vegetales (Engqvist-Goldstein *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2012; Craddock *et al.*, 2012; Nagawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013b; Guan *et al.*, 2013; Idilli *et al.*, 2013; Chebli *et al.*, 2013; Henty-Ridilla *et al.*, 2013). La unión del citoesqueleto de actina a vesículas cubiertas de clatrina está mediada por una batería de proteínas, entre las que se encuentran dinaminas, profilinas y el complejo ARP2/3 (Holstein, 2002; Hussey *et al.*, 2002). Su papel fundamental en endocitosis se evidenció mediante el uso de agentes despolimerizantes o secuestradores de actina como citocalasina D (Ketelaar *et al.*, 2008) y latrunculina B (Parton *et al.*, 2001; Grebe *et al.*, 2003; Ovecka *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Leucci *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Moscatelli *et al.*, 2012; Henty-Ridilla *et al.*, 2013), que inhiben la endocitosis de esteroides y la formación de compartimentos BFA (Geldner *et al.*, 2001; Baluska *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

1.2.4 Endocitosis en pelos radicales

La epidermis en la zona de diferenciación de la raíz está compuesta de células epidérmicas tipo pelos radicales, que se generan a partir de un tricoblasto y tienen un estatus de diferenciación peculiar, que se caracteriza por una extensión en forma tubular (*shank*, en inglés) que emerge de la raíz, y células epidérmicas que no se

extienden (*nonhair cell*, en inglés) y derivan de un atricoblasto (Grierson *et al.*, 2014; Salazar-Henao *et al.*, 2016; Stéger y Palmgren, 2022).

Los pelos radicales, al igual que los tubos polínicos, las hifas de hongos y las células del protonema (cadena filiforme de células al inicio del ciclo de vida de los musgos), presentan una extensión tubular polarizada, con crecimiento apical unidireccional muy definido. Su función principal es la de aumentar la superficie de absorción de agua y nutrientes. El crecimiento del pelo radical requiere de una constante síntesis de pared celular, organización del citoesqueleto, tráfico vesicular, endocitosis-exocitosis, el flujo citoplasmático que fluye por la periferia de la célula hacia la zona apical y desciende por la zona central de la célula (llamado flujo tipo fuente invertida) y una peculiar distribución de mitocondrias en la zona apical (Cárdenas, 2009; Libault *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2012). El abastecimiento de componentes de pared celular, así como de lípidos, proteínas y polisacáridos para mantener la composición y funciones de la membrana plasmática del pelo radical en crecimiento, demanda una alta actividad exocítica-endocítica en la zona apical del pelo. El flujo de vesículas en el ápice del pelo radical es un indicativo de sano crecimiento celular (Cárdenas, 2009).

La presencia de vesículas cubiertas de clatrina en la región subapical de pelos radicales en crecimiento y en tubos polínicos fue confirmada por inmunolocalización de la subunidad pesada de clatrina (Holstein, 2002). Varios estudios han revelado que los marcadores de membrana FM4-64 y FM1-43 son internalizados preferentemente en las regiones apicales de tubos polínicos en crecimiento (Parton *et al.*, 2001; Camacho y Malho, 2003) y de los pelos radicales (Ketelaar *et al.*, 2003). Por otro lado, proteínas potencialmente importantes para la endocitosis fueron localizadas recientemente en ápices de pelos radicales en crecimiento, incluyendo dinamina (Kang *et al.*, 2003), actina (Baluska *et al.*, 2000; Ketelaar *et al.*, 2003) y profilina (Baluska *et al.*, 2000). El movimiento de vesículas dependiente de actina ha sido evidenciado en los pelos radicales por la expresión de proteínas quiméricas fluorescentes del tipo Rab GTPasas (ARA6 y RabF2a) o con construcciones de fusión con el dominio-FYVE a GFP en ápices de pelos radicales de *Arabidopsis* y

Medicago (Voigt *et al.*, 2004). También se ha demostrado que las GTPasas pequeñas de la familia ROP (las Rho en animales) desempeñan un papel en la regulación de la actina filamentosa y el calcio en los pelos radicales y tubos polínicos (Yang, 2002).

1.2.5 Endocitosis en pelos radicales de frijol

Con el propósito de caracterizar la maquinaria de endocitosis en el pelo radical de frijol, nuestro grupo realizó una búsqueda bioinformática de genes de marcadores de endocitosis en frijol. Los resultados mostraron que el genoma de frijol codifica para la maquinaria de CME. Varios de los componentes de CME presentan una diversidad de isoformas similar a la reportada en *Arabidopsis*. Para identificar qué isoformas se expresan mayoritariamente en pelos radicales se realizó un análisis comparativo por RT-qPCR de la expresión de genes de endocitosis en distintas secciones de la raíz (en pelos radicales, ápice y raíz rasurada o desprovista de pelos radicales y del ápice), y se encontró que los genes *PvCLC2* y *PvCLC3* se expresan en pelos radicales (Tesis de Licenciatura de Elizabeth Monroy Morales, 2013). Su función en la nodulación fue explorada de manera individual por genética reversa, pero no se encontró un fenotipo distintivo, lo que sugiere redundancia de función de los genes CLC (Tesis de Licenciatura de Alfredo Capistran López, 2016).

Experimentos preliminares de nuestro grupo y de otros grupos de investigación, cuyo objetivo ha sido estandarizar la internalización y distribución del marcador de endocitosis fluorescente FM4-64 en pelos radicales de frijol (ver Anexo 2; Ketelaar *et al.*, 2003; Tesis de Licenciatura de Luis Alfredo Bañuelos Vázquez, 2009) indicaron que durante el crecimiento apical se observa la endocitosis de FM4-64 en el pelo radical, interesantemente la señal de FM4-64 es redistribuida en pequeñas vesículas localizadas, mayoritariamente, en la región apical del pelo radical. Cuando los pelos radicales se incuban con rhizobia, las vesículas endocíticas-exocíticas marcadas con FM4-64 se acumulan preferencialmente en el sitio donde el pelo radical forma el enroscamiento y atrapa a las bacterias para iniciar la formación del hilo de infección (Ketelaar *et al.*, 2003). En las etapas más avanzadas, las vesículas

marcadas con FM4-64 colocalizan con la región apical del hilo de infección en crecimiento (Tesis de Licenciatura de Luis Alfredo Bañuelos Vázquez, 2009).

2.- ANTECEDENTES

2.1 El receptor tipo cinasa SYMRK

El presente trabajo se enfoca en el estudio del receptor SYMRK, uno de los participantes esenciales en el establecimiento de la simbiosis leguminosa:rhizobia. El gen que codifica para este receptor fue identificado al caracterizar leguminosas mutantes deficientes en nodulación (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). La nomenclatura con la que este gen se ha descrito es diversa (SYMRK/DMI2/NORK/SYM19, Tabla 1), por lo que, para facilitar la lectura de este texto, al referirse a este receptor se utilizará el nombre de SYMRK.

Tabla 1. Nomenclatura de SYMRK y ortólogos

Leguminosa	Mutante	Nomenclatura	Referencia
<i>Lotus japonicus</i>	cac41.5	SYMRK (<u>s</u> ymbiosis <u>r</u> eceptor <u>k</u> inase)	Stracke <i>et al.</i> , 2002
<i>Medicago sativa</i>	MN1008	NORK (<u>n</u> odulation <u>r</u> eceptor <u>k</u> inase)	Endre <i>et al.</i> , 2002
<i>M. truncatula</i>	TR25	DMI2 (<u>d</u> oes <u>n</u> <u>m</u> ake <u>i</u> nfection <u>2</u>)	Endre <i>et al.</i> , 2002
<i>Pisum sativum</i>	P4 y P55	SYM19 (<u>s</u> ymbiosis 19)	Endre <i>et al.</i> , 2002
<i>Sesbania rostrata</i>	n.d.	SYMRK	Capoen <i>et al.</i> , 2005
<i>Phaseolus vulgaris</i>	n.d.	SYMRK	Sánchez-López <i>et al.</i> , 2011

n.d., no determinado

Análisis recientes muestran que el gen SYMRK está presente en el genoma de angiospermas (Markman *et al.*, 2008; Sánchez-López *et al.*, 2011) y que no sólo es esencial en la simbiosis leguminosas:rhizobia, sino también en la simbiosis planta:actinobacteria (Gherbi *et al.*, 2008) y planta:hongo micorrhízico (Markmann *et al.*, 2008; Nair y Bhargava, 2012; Genre y Russo, 2016; Huisman y Geurts, 2020). De aquí se desprende que el gen SYMRK forma parte de la ruta común de simbiosis (CSP por siglas en inglés de common symbiosis pathway), una ruta de señalización molecular muy conservada, que involucra la participación de varios genes identificados a la fecha (Oldroyd, 2013, Yang *et al.*, 2022).

No obstante, su relevancia en los procesos simbióticos, y la información sobre la expresión y función del gen SYMRK en plantas no inoculadas es muy pobre. Se ha centrado en el perfil de acumulación de transcrito en leguminosas y en la descripción

de la actividad del promotor SYMRK. El gen SYMRK se expresa en raíz, pero el transcrito es indetectable en hoja, flor, tallo y semilla (Bersoult *et al.*, 2005; Limpens *et al.*, 2005; Gherbi *et al.*, 2008; Markman *et al.*, 2008; Sánchez-López *et al.*, 2011).

2.1.1 La participación de SYMRK en la simbiosis leguminosa:rhizobia

La multiplicidad de funciones de SYMRK en el desarrollo del nódulo ha sido revelada mediante el análisis de mutantes defectuosas en la nodulación y en el uso de herramientas moleculares tales como experimentos de silenciamiento y de sobreexpresión (Catoira *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005; Markmann *et al.*, 2008; Sánchez-López *et al.*, 2011). La descripción fenotípica de mutantes de *M. truncatula* y *L. japonicus* deficientes en SYMRK, inoculadas con la rhizobia compatible, mostró que si bien no se presenta infección, ni organogénesis del nódulo, se inducen algunas de las respuestas en el pelo radical provocadas por los factores Nod, tales como hinchamiento y ramificación del pelo radical, inducción de algunas nodulinas tempranas como ENOD40, ENOD12 y rápido influjo de calcio, por citar algunas (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005). Sin embargo, no se observa el típico encurvamiento del pelo radical, por lo tanto, no hay atrapamiento de rhizobia, ni formación del IT, tampoco se induce la división de células corticales, es decir, se interrumpe el programa de desarrollo del nódulo en las etapas iniciales (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Shaw y Long, 2003; Esseling *et al.*, 2004; Capoen *et al.*, 2005; Miwa *et al.*, 2006). El fenotipo deficiente en nodulación de la mutante *Ljsymrk* se restaura completamente con las versiones Eurosidadas de SYMRK (*MtDMI2*, y SYMRK de *Datisca glomerata* y de *Tropaeolum majus*), pero no hay complementación con las versiones más cortas de SYMRK de las eudicotiledóneas no nodulantes como de *Papaver rhoeas* y *Lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersicum* y las monocotiledóneas *Oryza sativa* y *Zea mays* (Markmann *et al.*, 2008).

Otro dato interesante es el fenotipo de la mutante *Ljsymrk14*, descrito por Kosuta y col. (2011). Los autores reportaron que, en las plantas *Ljsymrk14* inoculadas con

rhizobia, las respuestas a nivel epidermal (en pelo radical) y cortical en la nodulación están desacopladas. El pelo radical presenta un atípico encurvamiento, tardío y excesivo, con grandes aglomeraciones de rhizobia en la parte apical. Los ITs presentan una estructura irregular y no cruzan la base del pelo radical (esto es, abortan tempranamente), pero hay división de células del córtex, por lo tanto, hay formación del primordio de nódulo. Esta mutante también presenta deficiencias en la formación del simbiosoma. Este fenotipo indica que SYMRK participa tanto en las etapas tempranas como en etapas tardías de la nodulación.

La evidencia de la participación de SYMRK en etapas tardías de este proceso fue reforzada con apoyo de estrategias de genética reversa, mediante la expresión heteróloga de RNA interferente (RNAi), cuyo blanco es el transcrito de SYMRK, y estudios de sobreexpresión de este receptor. El análisis por microscopía electrónica de los escasos *pseudo*-nódulos (que se circunscriben a estructuras pequeñas y blanquecinas) que se desarrollaron en raíces transgénicas de *S. rostrata* que expresaban *SrSYMRK*-RNAi indicó un defecto en la formación del IT, es decir, presentaba una forma irregular con protuberancias y una pared celular con depósitos de material. En estos *pseudo*-nódulos, las rhizobia no se virrieron a las células del tejido central del nódulo y, en consecuencia, no se observaron simbiosomas capaces de fijar nitrógeno (Capoen *et al.*, 2005). Resultados similares se obtuvieron al silenciar el gen *DMI2* (ortólogo de *SYMRK*) en raíces transgénicas de *M. truncatula* (Limpens *et al.*, 2005). La participación de SYMRK en la formación de los haces vasculares en nódulos de frijol fue demostrada en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo (Sánchez-López *et al.*, 2011).

Adicionalmente, los ensayos de complementación funcional de la mutante *Mtdmi2* aportaron evidencia de la regulación espacio-temporal de la expresión del ortólogo de *SYMRK* en *M. truncatula* (*DMI2*) durante la nodulación. La complementación por sobreexpresión ectópica, bajo el control del promotor 35S, rescató parcialmente la habilidad para formar hilos de infección y generar nódulos, pero éstos estaban vacíos, es decir, no había células infectadas, ni formación de simbiosomas. En

En el extremo C-terminal se encuentra el dominio cinasa del receptor, el cual está orientado hacia el entorno intracelular (Fig. 2). La mayoría de las mutantes deficientes en SYMRK, con fenotipo no-nodulante (*nod⁻* o *nod minus*), portan mutaciones en este dominio (Fig. 2). Por otro lado, se demostró que SYMRK es capaz de autofosforilarse y de fosforilar a otros sustratos *in vitro*, y se sabe que el estado de fosforilación afecta la regulación de la actividad cinasa (Yoshida y Parniske, 2005). Son 25 los posibles sitios de fosforilación en la estructura de SYMRK (predicción con apoyo del programa NetPhos2.0; Yoshida y Parniske, 2005). La sobreexpresión del dominio cinasa de SYMRK induce nodulación espontánea, en ausencia de rhizobia (Ried *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2014). Los estudios bioquímicos sobre la actividad de la cinasa de SYMRK y el estado de fosforilación ("fosfo-código") han demostrado que la activación de SYMRK depende de la fosforilación (Yoshida y Parniske, 2005; Samaddar *et al.*, 2013, Saha *et al.*, 2016). Estos estudios se han centrado en motivos específicos, así como en los residuos Ser/Thr y Tyr. Los ensayos de fosforilación *in vitro*, en los que se utiliza el dominio intracelular de SYMRK, expresado en *E. coli*, revelaron que los residuos mutados individualmente (*Lj*SYMRK T593A, *Lj*SYMRK T760A, *A. hypogaea* SYMRK T763A o *Ah*SYMRK Y670F/A/E) condujeron a una reducción significativa de las actividades de autofosforilación y de cinasa. Además, el fenotipo *nod⁻* de la mutante nula *Mtdmi2*, TR25 (Endre *et al.*, 2002), es parcialmente restaurado por *Ah*SYMRK (Y670/F/A), se forman IT anormales, cuya progresión se detiene en la interfaz epidérmica-cortical, aunque eventualmente, llegan a formarse nódulos vacíos (Saha *et al.*, 2016). Por otro lado, la sustitución del residuo Lys catalítico, presente en el motivo conservado VAVK e involucrado en fosfotransferencia, por un residuo de Glu (*Lj*SYMRK K622E), condujo a una pérdida de la actividad cinasa (Yoshida y Parniske, 2005; Saha *et al.*, 2014).

La caracterización de la estructura-función de los dominios LRR presentes en una serie de receptores ha permitido determinar su participación en interacciones proteína-proteína; y se ha postulado que en SYMRK, los dominios LRR pudieran tener una función tipo interacción ligando-receptor que induce a la autofosforilación o activación del dominio cinasa de este receptor (Yoshida y Parniske, 2005). No

obstante, esta hipótesis aún no ha sido abordada experimentalmente. De manera similar, la presencia del dominio tipo malectina permite predecir que SYMRK pudiera estar involucrado en el reconocimiento de un ligando glicosilado, ya se ha reportado que, en modelos animales, este dominio reconoce diversos tipos de oligosacáridos (Schallus *et al.*, 2008). Sin embargo, la función que desempeña este dominio en SYMRK durante la simbiosis o en receptores asociados a la percepción de patógenos aún está en proceso de caracterización (Hok *et al.*, 2011; Antolín-Llovera *et al.*, 2014b).

En conjunto, las características estructurales de SYMRK sugieren la percepción de ligandos extracelulares, cuya función pudiera estar relacionada con la activación (autofosforilación y/o transfosforilación) del dominio cinasa intracelular y la transducción de señales, lo que ha motivado la búsqueda de posibles interactores. Por el momento, esta pregunta se ha centrado en el dominio cinasa intracelular, cuyos posibles candidatos se han identificado mediante la técnica de dos híbridos en levadura (Y2H, por sus siglas en inglés *yeast 2 hybrid*): *MtSYMREM1* (remorina, Lefebvre *et al.*, 2010), *MtHMGR* (3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa1, Kevei *et al.*, 2007), *LjSIP1* (proteína tipo ARID con motivo de unión a DNA, Zhu *et al.*, 2008), *MtSIP2* (MAPKK, siglas en inglés de *mitogen-activated protein kinase kinase*; Chen *et al.*, 2012) y dos proteínas tipo ubiquitina-ligasa E3 *LjSIE3* y *LjSINA4 E3* (Yuan *et al.*, 2012; Den Herder *et al.*, 2012). Sin embargo, entender la relación funcional de estas proteínas con SYMRK es aún un reto. Respecto a la posible interacción de la región extracelular (dominios LRR y dominio malectina) con ligandos, así como el mecanismo de activación de este receptor son preguntas que aún no se han contestado.

2.1.2 PvSYMRK en *Phaseolus vulgaris*

La identificación y caracterización del receptor SYMRK en *P. vulgaris* se realizó en nuestro grupo de trabajo (Sánchez-López *et al.*, 2011). El gen *PvSYMRK* codifica para una proteína transmembranal de 919 residuos, con una masa molecular teórica de 103.2 KDa. La estructura primaria de *PvSYMRK* es similar a la de sus ortólogos

MtDMI2, *LjSYMRK* y *MsNORK*, con los que comparte una identidad de secuencia peptídica del 78%, 82% y 78%, respectivamente (Sánchez-López *et al.*, 2011).

El análisis por RT-qPCR de secciones de raíz de frijol no inoculada indica una mayor acumulación relativa del mensajero *PvSYMRK* en pelos radicales respecto al ápice y a la raíz desprovista de pelos radicales (J. Montiel, N. Nava y R. Sánchez-López, resultados no publicados). El análisis espacio-temporal de raíces transgénicas de frijol que portan el cassette *promPvSYMRK::GFP-GUS* (promotor de *PvSYMRK* en fusión transcripcional con la secuencia codificante quimérica GUS-GFP) reveló la actividad específica del promotor en raíces transgénicas de *P. vulgaris* no inoculadas e inoculadas con *R. tropici*. En las raíces no inoculadas, el promotor es activo en las células epidermales (incluyendo pelos radicales) y en el cilindro central de la zona de diferenciación de las raíces principal y laterales. No se observó actividad en las zonas del ápice, ni de elongación de la raíz. El análisis minucioso de raíces transgénicas inoculadas demostró la actividad del promotor de *PvSYMRK* en pelos radicales que respondieron a la inoculación con *R. tropici* CIAT899 y en las células corticales subyacentes a los sitios de infección, así como en las células del primordio del nódulo y en las células no infectadas del tejido central de nódulos jóvenes y nódulos maduros. Además, en nódulos maduros, el promotor de *PvSYMRK* es muy activo en los haces vasculares. Sin embargo, la actividad del promotor disminuye de manera significativa en el cilindro central de la raíz infectada (Tesis de Licenciatura de Karen Flores Canúl, 2013; Dávila-Delgado *et al.*, 2023; Fig. 3). Resultados similares fueron reportados al caracterizar el promotor de DMI2, ortólogo de SYMRK en *M. truncatula* (Bersoult *et al.*, 2005). Por otro lado, el perfil espacio-temporal de la actividad del promotor *PvSYMRK* correlaciona con el patrón de inmunodetección del receptor *PvSYMRK* en raíces de *P. vulgaris* pre- y post-inoculación con *R. etli* (Sánchez-López *et al.*, 2011). En ensayos tipo Western blot con anticuerpos policlonales *anti-PvSYMRK*, *PvSYMRK* se detecta en extractos de pelos radicales de plántulas de 2-4 días post-germinación (dpg), así como de raíz total y de nódulos (Sánchez-López *et al.*, 2011; Tesis de Maestría de Raúl Dávila Delgado, 2012).

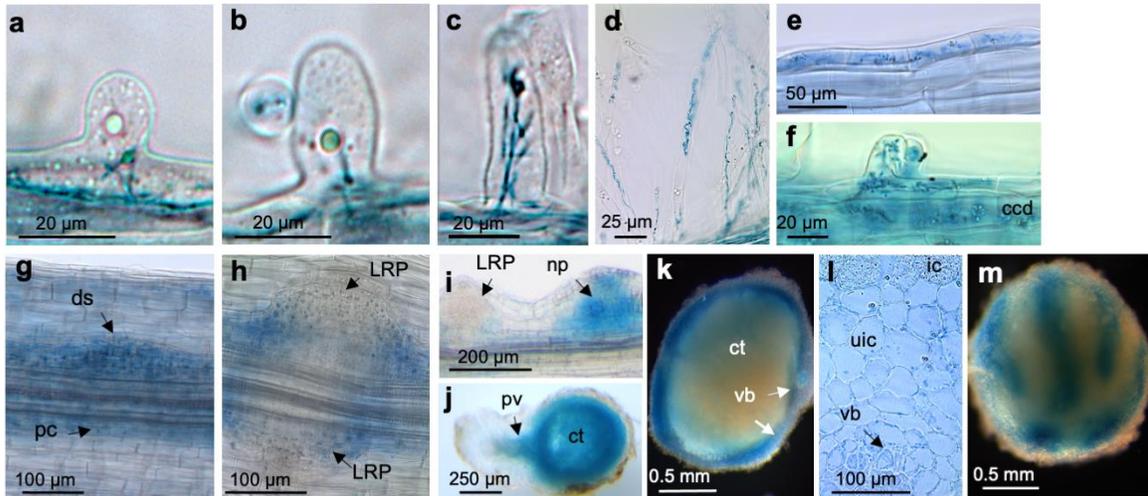


Figura 3. Actividad del promotor *PvSYMRK* en raíces de *Phaseolus vulgaris* no inoculadas e inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899. En las raíces no inoculadas, el promotor está activo en los pelos radicales en crecimiento (a-c) y maduros (d), y en las células epidermales tipo "nonhair" (e). La actividad promotora también se detecta en el periciclo y en las células en división que forman el primordio de raíz lateral (g). En etapas posteriores, la actividad se restringe a las células en la base del LRP (h-i). Tras la inoculación por rhizobia, se detecta actividad de pPvSYMRK en los pelos radicales curvados en respuesta a rhizobia y en las células corticales que experimentan las divisiones iniciales debajo del sitio de infección (f). Durante la organogénesis del nódulo, la actividad de pPvSYMRK se observa en las células que forman el primordio del nódulo (i), así como en el tejido central aún no bien organizado y en la zona provascular del nódulo joven (j). En el nódulo maduro, el promotor está activo en el haz vascular y en las células no infectadas del tejido central (k-m). La actividad del promotor se reveló mediante tinción histoquímica de la actividad GUS en raíces transgénicas que expresan el cassette pPvSYMRK::GFP-GUS. ccd, división celular cortical; ct, tejido central; ds, forma abovedada del LRP; ic, célula infectada; LRP, primordio de raíz lateral; np, primordio del nódulo; pc, células periciclo; pv, zona provascular; uic, célula no infectada; vb, haz vascular. Resultados reportados en la Tesis de Licenciatura de Karen Flores Canúl, 2013 y en Dávila-Delgado *et al.*, 2023, Anexo 6.

En experimentos de silenciamiento del gen *PvSYMRK* en raíces transgénicas de frijol que expresan *PvSYMRK*-RNAi e inoculadas con *R. tropici*, se encontró que no hay formación de nódulos, pero se forman unas escasas estructuras tipo *pseudo*-nódulos, en las cuales no hay células infectadas y presentan alteraciones en el sistema vascular (trazas de haces vasculares o distribución ectópica de los haces vasculares; Sánchez-López *et al.*, 2011). En conjunto estos datos indican que existe un mecanismo de regulación espacio-temporal de la expresión del gen *PvSYMRK* en la raíz y durante el proceso de nodulación en frijol.

2.1.3 SYMRK en pelos radicales y evidencias de su posible endocitosis

Con el objetivo de contar con una herramienta molecular que permitiera el análisis de la distribución subcelular del receptor *PvSYMRK* en raíces de frijol se generó una construcción que dirigiera la expresión de la proteína quimérica fluorescente *PvSYMRK-EGFP* bajo el control transcripcional del promotor constitutivo 35S (Tesis de Maestría de Raúl Dávila Delgado, 2012). En el análisis *in vivo* preliminar por microscopía de epifluorescencia de raíces transgénicas de frijol, se observó *PvSYMRK-EGFP* en células de la epidermis, incluyendo los pelos radicales, aparentemente en la membrana plasmática, tal como lo predice su estructura primaria (Fig. 2). Segundos después de agregar factores Nod (10 nM), en pelos radicales se induce una re-distribución de *PvSYMRK-EGFP* de la membrana plasmática hacia un patrón punteado intracelular, tipo vesicular. Estos resultados permitieron postular la internalización del receptor quimérico *PvSYMRK-EGFP* mediante un proceso endocítico (conclusión en Tesis de Maestría de Raúl Dávila Delgado, 2012). Resultados similares, sin mayor caracterización, se reportaron en un artículo tipo metodológico en el que analizan la expresión de DMI2-GFP en pelos radicales de raíces transgénicas de *M. truncatula* (Riely *et al.*, 2013).

La caracterización de las ubiquitina-ligasas E3, *LjSIE3*, *LjSINA4 E3* y *MtPUB2*, en interacción con el dominio cinasa de SYMRK, refuerza la hipótesis de la endocitosis de este receptor (Yuan *et al.*, 2012; Den Herder *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018). La ubiquitinación de proteínas es un proceso *post*-traduccional en células eucarióticas, siendo la ubiquitina-ligasa E3 la enzima que cataliza la reacción. Este proceso está asociado a diversos mecanismos celulares: degradación, localización, endocitosis y/o estabilización de proteínas (Piper y Lehner, 2011). La ubiquitinación de un receptor u otro tipo de proteína de membrana plasmática es una señal para desencadenar la endocitosis y, eventualmente, degradar la proteína ubiquitinada (Robatzek *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2011; Den Herder *et al.*, 2012; Schwihla y Korbei, 2020), probablemente como un mecanismo para regular la transducción de señales (Le Roy y Wrana, 2005; Lu *et al.*, 2011). La co-expresión de SYMRK-mOrange y *SINA4 E3 DN-YFP* (dominante negativa, versión inactiva) en hojas de tabaco induce

una redistribución de SYMRK en la membrana plasmática a un patrón punteado que co-localiza con la fluorescencia de SINA4 E3 DN-YFP en la periferia de las células. No así cuando se expresa SINA4 E3-YFP (tipo silvestre, activa). Adicionalmente, la sobreexpresión de SINA4 E3 en hojas de tabaco y en raíces noduladas correlaciona con una disminución en la abundancia de SYMRK (Den Herder *et al.*, 2012). Los autores de este trabajo sugieren que, en presencia de SINA4 E3, se induce un mecanismo de internalización, procesamiento y/o degradación de SYMRK.

Otro potencial interactor de SYMRK y de los receptores de los factores Nod (*MtNFP* y *MtLYK3*) es la remorina *MtSYMREM1*, que inmunolocaliza en el entorno de invasión de rizobia, es decir, en la membrana plasmática del IT y en la membrana del simbiosoma (Lefebvre *et al.*, 2010). Las proteínas de la familia remorina son, específicas de plantas vasculares y se localizan en la cara interna de la membrana plasmática, en subcompartimentos o microdominios tipo balsas lipídicas (Mongrand *et al.*, 2004; Jarsch y Ott, 2011), lo que sugiere que pueden estar involucradas en la relocalización de proteínas en respuesta a estímulos, por ejemplo, en las interacciones planta-microorganismo (Campo *et al.*, 2008; Rocco *et al.*, 2008).

2.2 Planteamiento de la pregunta

Aún son muchas las interrogantes sobre el mecanismo de acción del receptor tipo cinasa SYMRK en raíz y durante la nodulación. La percepción de los factores Nod por los receptores específicos tipo cinasa NFR1/5 o NFP es un requisito para que SYMRK realice sus funciones en el pelo radical de las leguminosas. Por su estructura primaria, SYMRK se define como un receptor que percibe una señal, lo que induce la activación del dominio cinasa intracelular y, en consecuencia, activa una cascada de transducción de señales, que potencialmente pasa por auto y/o transfosforilación. En conjunto, los datos sobre la estructura-función de SYMRK, que prueban la escisión de MLD, el "fosfo-código", la redistribución subcelular dinámica y la interacción proteína-proteína con las ubiquitina-ligasas E3, sugieren la endocitosis de SYMRK como parte de la señalización necesaria para iniciar la infección en la epidermis. Esta hipótesis ha sido sugerida por varios autores, sin embargo, no ha sido abordada formalmente.

Inspirado por la comprensión actual sobre el papel relevante de un paso endocítico en la actividad de señalización de otros RLKs de plantas, como FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) y proteínas PIN (Antolín-Llovera *et al.*, 2014b; Ivanov y Vert, 2021), en este estudio investigamos si *PvSYMRK* se endocita como parte del mecanismo molecular de señalización que inicia la nodulación en frijol.

3.- HIPÓTESIS

La incubación con rhizobia induce la endocitosis del receptor quimérico *PvSYMRK-EGFP* en la epidermis de la raíz.

4.- OBJETIVO

Evaluar la endocitosis de *PvSYMRK* en pelos radicales de frijol incubados con rhizobia.

4.1 Objetivos particulares:

1. Generar la construcción p*PvSYMRK::PvSYMRK-EGFP_p35S::LifeAct-mTurquoise2*.
2. Analizar la distribución subcelular de *PvSYMRK-EGFP* y *LifeAct-mTurquoise2* en células corticales y en pelos radicales.
3. Evaluar la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* en células epidermales y en pelos radicales de frijol incubados con rhizobia, de acuerdo con los siguientes criterios:
 - Evaluar el efecto de inhibidores específicos de endocitosis (TyrA23 e IKA), y de tráfico vesicular (BFA), en la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP*.
 - Evaluar la endocitosis de versiones de *PvSYMRK-EGFP* con mutaciones en sitios específicos de endocitosis (YKTL) y de fosforilación (T589A y K618E).

5.- METODOLOGÍA

5.1 Germinación de semillas de frijol variedad Negro Jamapa. Las semillas se desinfectaron con una solución de alcohol al 70% en agua por 1 min y seguido por una de cloro al 20% durante 5 min, con lavados intermedios con agua estéril. La germinación de las semillas se llevó a cabo en una charola estéril sobre un papel absorbente humedecido con medio Fåhraeus líquido, a 28 °C durante 48 h en total oscuridad.

5.2 Preparación de rhizobia e inoculación de plantas. Plántulas de 2 días después de la germinación (dpg), o plantas compuestas con raíces transgénicas se transfirieron a macetas que contiene vermiculita y se inocularon con *R. etli* CE3 o *R. etli* CE3 pMP604 (Dávila-Delgado *et al.*, 2020, Anexo 5). Las cepas de rhizobia se cultivaron en medio líquido PY (5 g/l de peptona, 3 g/L de extracto de levadura) con cloruro de calcio 7 mM, ácido nalidíxico (20 µg/ml), estreptomycin (100µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml); se incubaron a 30°C por 48 h en agitación constante. Una vez que el cultivo creció, el inóculo se transfirió de la siguiente manera: el cultivo se pasa a tubos para centrífuga estériles y se centrifugó a 5000 revoluciones/min durante 6 min a 4°C (Centrifuga 5418, Eppendorf), el sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con MgSO₄ 10 mM, el lavado se repitió una vez más y finalmente el inóculo se diluyó en MgSO₄ 10 mM a DO_{600nm} 0.05 unidades. Las plantas se cultivaron en invernadero con condiciones ambientales controladas (28°C, fotoperíodo 16 h/8 h) y fueron regadas con medio Fåhraeus libre de nitrógeno (Fåhraeus, 1957).

5.3 Montaje de plántulas en caja Petri. La planta se colocó en una caja Petri que presenta dos modificaciones importantes. Por un lado, una ranura (de 0.5 cm de ancho) en la pared de la base de la caja de Petri, que soporta el tallo de la planta cuya raíz será analizada. Por otro lado, un orificio cuadrado en el centro de la base de la caja, que se cubre con un portaobjetos (1 mm espesor) pegado (con silicón) a la base de caja. Sobre el portaobjeto se colocó la raíz a observar, se adicionó medio Fåhraeus líquido a la raíz, se cubrió con una película de papel de celulosa (celofán dulce) con horadaciones que se hacen coincidir con la zona de la raíz que contiene

pelos radicales, se observó al microscopio hasta identificar pelos radicales vivos, en crecimiento, y se agregaron los inhibidores en la zona adyacente al pelo radical en observación, evitando generar turbulencia.

5.4 Agroinfiltración de hojas de tabaco. Las semillas de tabaco se desinfectaron con una solución de 20% cloro y 2% Triton X100 en agua durante 5 min y se incuban en agar suave al 0.1% durante 16 h a 4°C previo a su germinación, que se realiza en cajas con medio sólido MS al 0.5% (NH₄NO₃ 16,5 mg/ml; KNO₃ 19 mg/ml; CaCl₂.2H₂O 4,4 mg/ml; MgSO₄.7H₂O 3,7 mg/ml; KH₂PO₄ 1,7 mg/ml; MnSO₄.H₂O 1,69 mg/ml; ZnSO₄.7H₂O 0,86 mg/ml; H₃BO₃ 0,62 mg/ml; KI 0.083 mg/ml; Na₂MoO₄.2H₂O 0.025 mg/ml; CuSO₄.5H₂O 0.25 mg/ml; CoCl₂.6H₂O 0.25 mg/ml; FeSO₄.7H₂O 0.00556 mg/ml; Na₂EDTA.2H₂O 0.00746 mg/ml), suplementado con 1% sacarosa, 10 mM buffer MES, pH 5.6. Las cajas fueron incubadas en posición vertical a 28°C durante 7 días. Posteriormente, las plántulas se transplantaron a macetas con Metromix como sustrato y se continuó el crecimiento de la plántula a 28°C en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de luz/obscuridad de 16 h/8 h durante 6 semanas, con riego cada 3 días con solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971). Después de este tiempo, las hojas de tabaco son susceptibles de ser agroinfiltradas con la clona de *A. tumefaciens* cepa GB1301 que porta las construcciones de interés. Las bacterias se crecen previamente en 3 ml de medio LB líquido en presencia de los antibióticos apropiados (espectinomicina 200 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml), durante 48 h a 28 °C en agitación constante. Se tomaron 100 µl de este cultivo y se transfirieron a 6 ml de medio LB líquido sin antibiótico, suplementado con 10 mM buffer MES, pH 5.6 y 5 µl de acetosiringona 100 mM, el cultivo se creció durante 16 h a 28°C. Una vez que el cultivo alcanzó una de DO_{600nm} de 1.0, se centrifugó a 4000 rpm (Centrifuga 5418, Eppendorf) durante 10 min y la pastilla se resuspendió en 5 ml de 10 mM MgCl₂. Se agregaron 5 µl de acetosiringona 100 mM y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 3 h. Previo a la agroinfiltración, las plantas de tabaco se dejaron en total oscuridad durante 24 h, esto para favorecer la infiltración de la bacteria. El volumen total de la suspensión de bacterias se tomó en una jeringa (sin aguja) de 5 ml y mediante presión mecánica se inyectaron en el envés de la hoja, procurando

infiltrar en la mayor área posible. Se agroinfiltraron 3 hojas por planta, de un total de 3 plantas por construcción. Las plántulas se incubaron a 28°C durante 2 días para después observar las hojas al microscopio de fluorescencia.

5.5 Observación de hojas de tabaco agroinfiltradas. La observación de las hojas de tabaco agroinfiltradas, se realizó dos o tres días después de la agroinfiltración. Con ayuda de un sacabocado de 4 mm de diámetro, se cortó el segmento de hoja que fue agroinfiltrado y se dejó en agua durante 15 min para después observarse directamente al microscopio de epifluorescencia (SXZ7, Olympus).

5.6 Construcciones de plásmidos. El plásmido pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquesa se construyó en tres pasos (ver Anexo 1): Paso 1) para generar el cassette p35S::LifeAct-mTurquoise2, un DNAC quimérico que codifica para LifeAct-mTurquoise2 (772 pb) se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos: LifeAct LUP, que comprende 51 nucleótidos que codifican para el dominio de unión a actina, conocido como LifeAct (Vidali *et al.*, 2009), en marco con 15 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia codificante de mTurquoise2, y el oligonucleótido mCherry LW. El plásmido pmTurquoise2-ER se utilizó como templado. LifeAct-mTurquoise2 fue subclonado por recombinación en el vector pK2GW7 para generar la fusión transcripcional p35S::LifeAct-mTurquoise2 (pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2). Paso 2) Construir el cassette pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP (5152 pb), el DNAC de PvSYMRK se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos 5UTR UP y PvSYMRK LW y se clonó por recombinación en el plásmido pH7FWG2, creando el cassette p35S::PvSYMRK-EGFP-T35S. El siguiente paso fue sustituir el promotor 35S por el promotor endógeno (fragmento HindIII) del cassette pPvSYMRK::GFP-GUS para generar el plásmido pH7FWG2-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP. Este plásmido fue el templado para una reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos MauPvRLK-H5' y T35S_SacI; el producto de PCR (5425 pb) se clonó en pENTR™/D-TOPO™ (Invitrogen), generando pENTR-MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI. 3) Para construir el plásmido pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquoise2, se digirió el plásmido pENTR-

MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI con las enzimas de restricción MauBI y SacI y el fragmento liberado se clonó en el sitios de restricción correspondientes en pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2, dando lugar a pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquesa. En todos los casos, los fragmentos amplificados por PCR se clonaron primero en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), y posteriormente se subclonaron por recombinación con el vector de expresión en plantas adecuado con la mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase™ II (Invitrogen). Todos los pasos de clonación se realizaron en *E. coli* DH5a, se confirmaron mediante secuenciación y posteriormente los plásmidos se electroporaron en *A. rhizogenes* K599, para su expresión en plantas. La información de los oligonucleótidos se encuentra en la Tabla 2.

5.7 Amplificación por PCR. La amplificación de secuencias de DNA por PCR, cuyo destino es su clonación en el vector intermediario (de entrada) pENTR™/D TOPO® (Invitrogen), se llevó acabo utilizando 1 U de la enzima de alta fidelidad DNA polimerasa *Pfu* (Fermentas), buffer de reacción [20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA, 2 mM MgSO₄; Fermentas], 0.2 mM dNTP's, 0.2 μM de cada oligonucleótido gen-específico y 2.5 ng de DNA como templado en un volumen final de 25 μl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 2 min a 94°C (desnaturalización), seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a la T_m de los oligonucleótidos gen-específicos y 3 min a 72°C (extensión). El tamaño del producto amplificado se verificó por electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para generar y analizar las construcciones descritas en este trabajo

Nombre	Secuencia
LifeAct LUP	5'CACCATGGGTGTCGCAGATTTGATCAAGAAATTCGAAAGCA TCTCAAAGGAAGAAGTGAGCAAGGGCGAG3'
LifeAct SUP	5'ATGGGTGTCGCAGATTTGATCAAG3'

mCherry UP	5'CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG3'
mCherry LW	5'CTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC3'
LifeActLW	5'CTATTCTTCCTTTGAGATGCTTTCGAA3'
RS-GFP3	5'CAGCTTGCCGTAGGTGGC3'
MaupPvRLK-H5'	5'CACCCACCTGCAAGCTTCCGGGCTGGTAAAATCTTAGGC3'
PvECICGFP3Sma	5'TCTCGGCTGTGGATGGGACAAGGCCCGGG3'
RL3-2	5'CACCTCTACAAGTCCTAC3'
RL7-2	5'GGCAGTGAGGCAATTGATT3'
RL3-4	5'ACTCTCTATTGCTCTTGGT3'
PvECICGFP3	5'TCTCGGCTGTGGATGGGACAAGGC3'
pPvRLKH5'	5'CACCAAGCTTCCGGGCTGGTAAAATCTTAGGC3'
GW3RLK	5'AACTTGTCTCTTGTGAAAGATTTTGACGCC3'
RL3-1	5'GAAGATTTATGGTACTAGGT3'
RL3-3	5'ATCAATTGCCTCACTGCC3'
RL7-3	5'ACCAAGAGCAATAGAGAGT3'
T35S-Sacl	5'AAGAGCTCCCTCTAGAGGGCCCGACG3'
PvSYMRKT589A_Fw	5'TTTGGAAGATATAGAGGTGGCCGCAGAAAGGTACAAAACAT TG3'
PvSYMRKT589A_Rv	5'CAATGTTTTGTACCTTTCTGCGGCCACCTCTATATCTTCCAA A3'
PvSYMRKK622E_Fw	5'TCAAGAAGTGGCAGTGGAAGTCCGTTTCCAGCCA3'
PvSYMRKK622E_Rv	5'TGGCTGAACGGACTTCCACTGCCACTTCTTGA3'
PvSYMRKT756A_Fw	5'TCTTGAAGTCAGAGGAGCTGCAGGGTACCTGGATCC3'
PvSYMRKT756A_Rv	5'GGATCCAGGTACCCTGCAGCTCCTCTGACTTCAAGA3'

PvSYMRKdelYKTLF	5'ATATAGAGGTGGCCACAGAAAGGATAGGGGAAGGAGGATT TGGTT3'
PvSYMRKdelYKTLR	5'AACCAAATCCTCCTTCCCCTATCCTTTCTGTGGCCACCTCT ATAT3'
5UTR UP	5'CACCCCTGCCGTTTCCAGGCTTG3'
PvSYMRK LW	5'TCTCGGCTGTGGATGGGACAAGGC3'

5.8 Método de amplificación por PCR a partir de colonia bacteriana. Con ayuda de un asa, se pasó una colonia bacteriana a 50 µl de agua estéril, se resuspendió vigorosamente y se congeló a -80°C durante 10 min, para después desnaturalizar el DNA a 100°C durante 10 min. Este paso se repitió 5 veces, después se centrifugó a 4000 rpm (Centrifuga 5418, Eppendorf) durante 1 min y se tomó 1 µl del sobrenadante como templado para una reacción de PCR en 25 µl. Esta reacción se realizó como se describe en inciso anterior, pero utilizando la enzima DNA polimerasa Taq Recombinante (Fermentas). El buffer de reacción se compone de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% (v/v) Triton X 100 y 3 mM MgCl₂. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 50°C y 1 min a 72°C.

5.9 Digestión con enzimas de restricción. Los plásmidos pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3 y pK2GW7::LifeAct-Turquoise2 cuentan con los sitios de digestión MauBI/SmaI y MauBI/SacI, respectivamente, la digestión enzimática se procedió utilizando el buffer Tango 10X (33 mM de Tris-acetato pH 7.9, 10 mM de acetato de magnesio, 66 mM de acetato de potasio y 0.1 mg/ml de BSA). Para el caso de MauBI/SmaI se hizo una digestión secuencial, primero se digirió con SmaI a 30°C durante una hora y después con MauBI a 37°C durante una hora. La digestión de MauBI/SacI se realizó a 37°C durante una hora, pero se agregó el doble de unidades de la enzima SacI con respecto de la enzima MauBI. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis horizontal de DNA.

5.10 Ligación de fragmentos de DNA. Los productos de la digestión enzimática se purificaron del gel de agarosa utilizando el kit GeneJET Gel Extration (Thermo

Fisher Scientific), y el DNA recuperado se cuantificó por Nanodrop. El vector destino se desfosforiló utilizando la enzima fosfatasa alcalina (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific), según lo indicado por el proveedor. Finalmente, el vector destino y el fragmento a ligar se prepararon en una relación molar 1:3 y se procedió la reacción de acuerdo a indicaciones del proveedor durante 10 min a 22°C. El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5α.

5.11 Sistema de clonación por recombinación (Gateway® Cloning, Invitrogen).

La estrategia consistió en dos pasos, el primero fue la clonación de la secuencia de DNA de interés en el vector de entrada pENTR™/D TOPO® (Invitrogen). La segunda fue la recombinación del inserto (clonado en el vector pENTR™/D TOPO®) en el vector destino de interés, en nuestro caso los vectores de expresión en plantas pH7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) y pK2WG7. En ambas etapas de clonación se procedió según lo indicado por el proveedor. Las colonias positivas se seleccionaron siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 5.8.

5.12 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*.

La transformación de *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 y *A. tumefaciens* cepa GB1301 con las construcciones en los vectores pH7FWG2 o pK2GW7 se llevó a cabo por electroporación bajo condiciones estándar (1.6 volts durante dos segundos). Las células se recuperaron en medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.0025 M KCl, 0.01 M MgCl₂, 0.01 M NaCl, 0.02 M glucosa, pH 7) durante 2 h a 30°C. Las células viables se distribuyeron homogéneamente en cajas Petri con medio LB (Luria-Bertani: 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl, pH 7.5) en presencia de 200 µg/ml espectinomicina (para *A. tumefaciens* también se agregó rifampicina [100 µg/ml] y gentamicina [50 µg/ml]), y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Las colonias positivas se seleccionaron siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 5.8.

5.13 Generación de raíces transgénicas de frijol.

La generación de raíces transgénicas se basa en el protocolo descrito por el grupo del Dr. Federico Sánchez (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), con algunas modificaciones. En breve, las plantas de frijol, germinadas bajo condiciones de desinfección durante 2 días a 28°C, se

inocularon con una suspensión de *Agrobacterium rhizogenes* K599 previamente transformado con la construcción de interés. La inoculación se realizó alrededor del nodo del cotiledón, hiriendo levemente con la aguja de una jeringa para inmediatamente inyectar 5-10 μ l de la suspensión de bacterias. Posteriormente, las plantas se transfirieron a tubos de boca ancha que contienen un tubo falcon de 15 ml con medio Fähræus líquido. Las plantas se colocaron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo luz/obscuridad de 16 h/8 h, a temperatura constante de 28°C durante 7-10 días hasta observar el desarrollo de pequeños tumores en el sitio de inoculación y la formación de primordios de raíces. Se determinó cuáles de los primordios de raíz son tipo transgénicos mediante observación directa de la planta bajo un estereomicroscopio con iluminación epifluorescente (SXZ7, Olympus) y utilizando como criterio de selección la fluorescencia de Life-Act-mTurquoise2, como marcador transgénico fluorescente. Se eliminaron los primordios de raíz no fluorescentes para favorecer el desarrollo de las raíces transgénicas que expresen la proteína quimérica. Previo a la observación al microscopio, se permitió que las raíces fluorescentes se recuperaran por dos días. Las raíces transgénicas se colocaron en una caja Petri que contiene un orificio en el centro, cubierto con un portaobjetos pegado a la caja (Cárdenas *et al.*, 2008). Se adicionó medio Fähræus líquido a la raíz, se cubrió con una película de papel de celulosa (celofán dulce) y se realizó la observación directa al microscopio.

5.14 Mutagénesis sitio dirigida. La generación de las versiones mutantes en sitios de fosforilación y la eliminación del motivo de endocitosis YKTL de *PvSYMRK-EGFP* se llevaron a cabo usando la metodología descrita en QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit. Brevemente, la mutagenesis se realizó usando oligonucleótidos específicos (Tabla 2) que portan la mutación a introducir, el plásmido pENTR-MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI, como templado y una versión de DNA polimerasa de alta fidelidad, con un máximo de 18 ciclos de amplificación. Finalmente, se agregó la enzima de restricción DpnI a la mezcla de reacción de PCR para digerir el templado de partida (metilado). Las versiones mutantes se clonaron en el vector pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2 para su expresión en planta.

5.15 Visualización *in vivo* y tratamiento de pelos radicales con sondas fluorescentes e inhibidores. El marcador fluorescente lipofílico FM4@-64 se preparó a 6.6 ng/μl. Para definir el tiempo óptimo de incubación con FM4@-64, las plantas se colocaron sobre una caja de Petri modificada, como descrito previamente, y por microscopía de epifluorescencia o confocal se identificó un pelo radical vivo y en franco crecimiento, se agregó FM4@-64 y se capturaron imágenes durante 30-60 min con intervalos de 10 min.

Para determinar la concentración de cada inhibidor, se hizo una búsqueda en la literatura del rango de concentraciones reportadas y partir de las cuales se diseñaron ensayos de dosis-respuesta (Anexo 2). Las plantas compuestas se colocaron en la placa de Petri modificada de modo que las raíces transgénicas se montaron en la cámara/cubreobjetos que contenían 2-3 ml de medio líquido Fåhræus, cubiertas con una lámina de celulosa transparente (celofán dulce) con varios agujeros dispersos de 6 mm de diámetro y se dejó adaptar a estas condiciones durante 24 h a 28°C y un fotoperiodo de 16 h/8 h luz/oscuridad. Se seleccionaron secciones epidermales en la zona de diferenciación de raíces transgénicas que expresaban el cassette pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP mediante microscopía confocal y los inhibidores del tráfico vesicular o endocitosis se administraron directamente (incubación puntual) a través de un orificio en la lámina de celulosa. Las imágenes se adquirieron a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60-90 min después de la incubación con el inhibidor. Se usaron inhibidores: Brefeldina A (BFA) 100 μM, cicloheximida (CHX) 50 μM, ikarugamicina (IKA) 20 μM, tirfostina A23 (TyrA23) 50 μM y tirfostina 51 (Tyr51) 50 μM.

5.16 Captura de imágenes. Las imágenes se capturaron como varios planos en Z, cada uno con un grosor de 0,70-0,77 μm y un tiempo de exposición al láser de 300-400 ms utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I (Zeiss Observer Z.1 tipo invertido; Intelligent Imaging Innovations Ltd, Reino Unido), con objetivos x40 de inmersión en agua o en aceite (0,75 y 1,3 NA, respectivamente) con una cámara EMCCD Andor Ixon 3, modelo DU-897E-CS0-#BV (tecnología Andor) controlada por SlideBook6 (software de microscopía digital; Intelligent

Imaging Innovations Ltd, Reino Unido). EGFP y mTurquoise2 se excitaron a 488 y 445 nm, respectivamente, y la emisión de fluorescencia se recogió a 507 nm para EGFP y 474 nm para mTurquoise2.

5.17 Procesamiento de imágenes y evaluación cuantitativa de estructuras punteadas en células epidermales y pelos radicales. Las imágenes confocales de la epidermis de las raíces transgénicas se obtuvieron como *stacks* z y luego se transformaron en imágenes 2D utilizando la herramienta Z-project de ImageJ. Las células epidermales se delimitaron con la herramienta de selección Polygon y la cuantificación de los *puncta* fluorescentes intracelulares (puntos diminutos redondeados) se realizó con la herramienta Find Maxima (ajustando la tolerancia al ruido de fondo). El área de cada célula se estimó como el área total delimitada por el polígono. Para facilitar la visualización de los *puncta* fluorescentes intracelulares, imágenes representativas fueron procesadas por deconvolución 3D realizado con el *plugin Parallel Iterative Deconvolution*, utilizando el método WLP y Wiener Filter gamma con los siguientes parámetros: weiner = 0.001, número máximo de iteraciones = 100, terminar = 0.01 (si el delta medio es menor que este valor) y precisión = doble. Esta metodología requiere una función de dispersión de punto normalizada (PSF, siglas en inglés *point spread function*) creada con el *plugin Diffraction PSF 3D*, utilizando los siguientes parámetros: índice de refracción de la mediana de montaje = 1,3 (agua) o 1,5 (aceite de inmersión); apertura numérica NA = 0,75 y 1,3 (agua y aceite de inmersión respectivamente), longitud de onda = 507 nm para EGFP, 474 nm para mTurquoise2; ancho = 64 píxeles y alto = 64 píxeles. Las imágenes deconvolucionadas se editaron ajustando el brillo y el contraste y agregando pseudocolor.

5.18 Análisis estadístico. Para validar el análisis cuantitativo y confirmar la reproducibilidad de los resultados, se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples con el método de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism versión 6 y considerando una serie de réplicas biológicas, como se indica en cada figura.

6.- RESULTADOS

6.1 Análisis de la expresión de las proteínas quiméricas fluorescentes PvSYMRK-EGFP y LifeAct-mTurquoise2 en raíces transgénicas de frijol

Las raíces transgénicas utilizadas en este proyecto fueron generadas por transformación mediada por la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* K599 que porta la construcción pK2GW7- pPvSYMRK::PvSYMRK-p35S::LifeAct-mTurquoise2 (ver Anexo 1, Fig. 33). La expresión del marcador molecular de citoesqueleto de actina, LifeAct-mTurquoise2, cumplió con dos propósitos: por un lado, la identificación de raíces transgénicas por análisis de estereomicroscopía de epifluorescencia (ver Anexo 1, Figs. 21, 26 y 27). Por otro lado, LifeAct-mTurquoise2 permitió distinguir los pelos radicales que presentan respuesta a rhizobia, es decir, pelos radicales con rearrreglos de citoesqueleto de actina. Se encontró que entre un 30-40% de las raíces pilosas generadas expresan LifeAct-mTurquoise2.

El análisis *in vivo* por microscopía confocal de disco giratorio de la zona de diferenciación de las raíces transgénicas, no inoculadas con rhizobia, mostró que la quimera PvSYMRK-EGFP se expresa en la epidermis, tanto en pelos radicales, como en células epidermales tipo "*nonhair*". En ambos tipos celulares PvSYMRK-EGFP se citocolocaliza, mayoritariamente, en membrana plasmática y en estructuras intracelulares punteadas en células epidermales (Fig. 4; Dávila-Delgado *et al.*, 2023, Anexo 6). Un patrón similar de distribución de MtDMI2-GFP fue reportado en pelos radicales de *M. truncatula* (Riely *et al.*, 2013). La observación de este patrón en células epidermales de raíz de estas dos leguminosas llevó al planteamiento de la posible endocitosis constitutiva de PvSYMRK-EGFP.

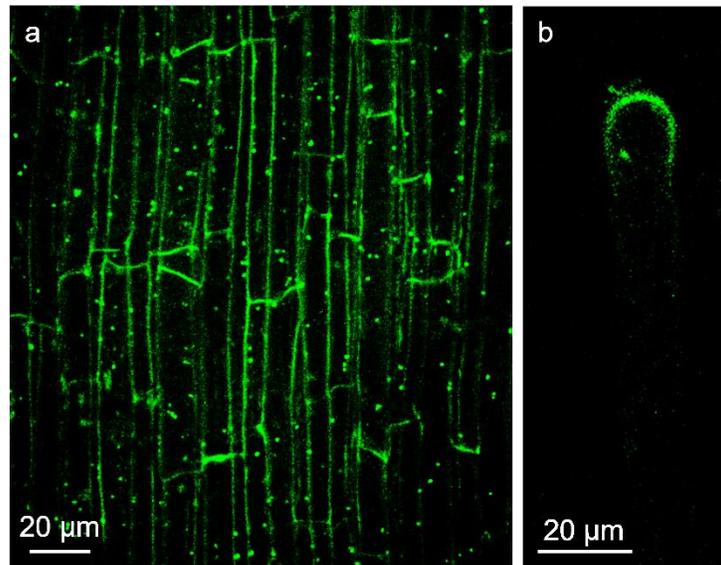


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de disco giratorio *in vivo* representativas de la epidermis de la raíz y de pelos radicales transgénicos de *P. vulgaris*, que portan el cassette pPvSYMRK::PvSYMRK-p35S::LifeAct-mTurquoise2. (a) Epidermis, (b) pelos radicales. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I Zeiss Observer Z.1 tipo invertido, (LNMA, Instituto de Biotecnología-UNAM).

Es de mencionar que los pelos radicales son células muy sensibles a acciones mecánicas asociadas a la manipulación (p. ej. cambio del medio), y se han observado respuestas no específicas, como la alteración del citoesqueleto del pelo radical (Esseling *et al.*, 2004), que *per se* pueden interferir con la dinámica de endocitosis-exocitosis y el tráfico de vesículas, y conducir a interpretaciones erróneas. Por lo que la caracterización inicial de las estructuras subcelulares punteadas marcadas con PvSYMRK-EGFP se llevó a cabo en células epidermales tipo "*nonhair*".

Para analizar a detalle la distribución punteada de PvSYMRK-EGFP, se capturaron imágenes de epidermis de varios lotes de raíces transgénicas y se evaluaron 64 células epidermales tipo "*nonhair*" de 29 raíces transgénicas y se procesaron utilizando el software Image J con el propósito de cuantificar las estructuras fluorescentes tipo "punto", a partir de aquí referidas como "*puncta*", por 1000 μm^2 . Los resultados en la Fig. 5 muestran que el número de *puncta* fluorescentes presentes en las células que expresan a PvSYMRK-EGFP es relativamente constante 9,0 ($\pm 0,3$ SEM) por 1000 μm^2 , aún cuando las imágenes se capturan a 24, 48 y 72 horas *post*-montaje (dato no mostrado). Por lo tanto, las células

epidermales se convierten en un modelo adecuado para evaluar de dónde provienen los *puncta* enriquecidos en PvSYMRK-EGFP y sustentar la hipótesis de la endocitosis de este receptor.

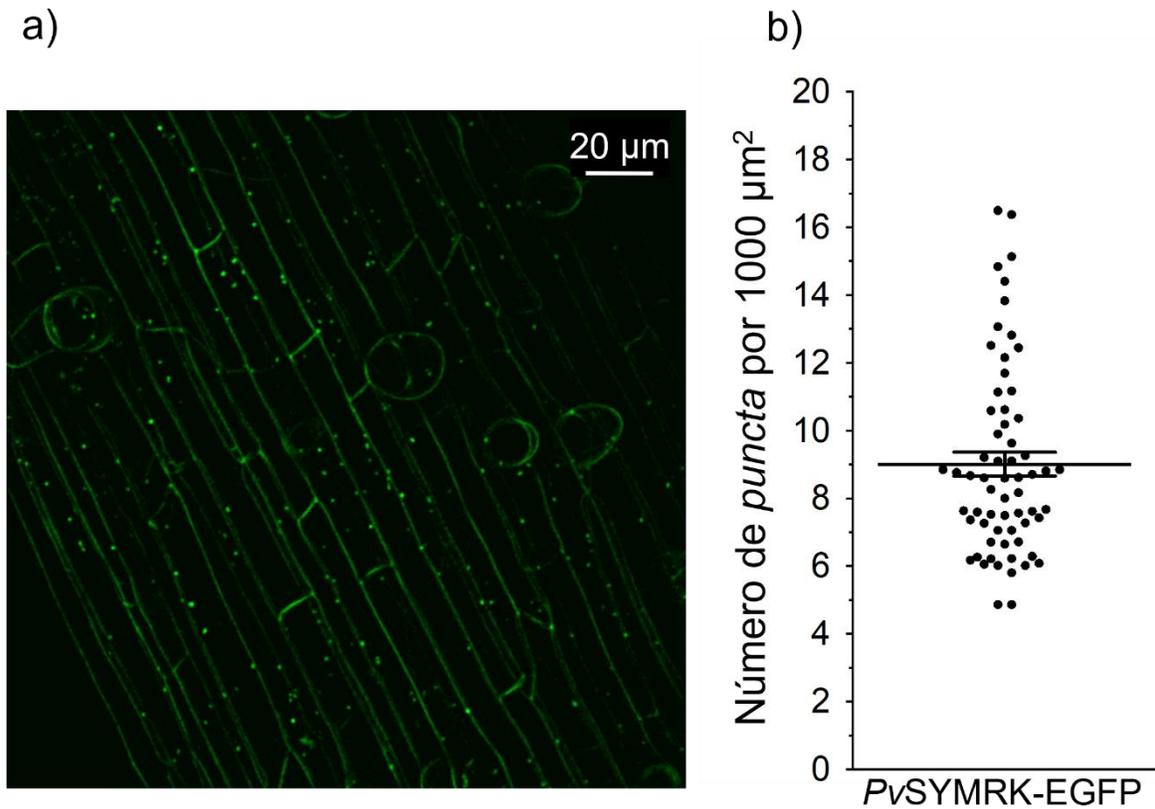


Figura 5. Evaluación cuantitativa del número de estructuras punteadas (*puncta*) marcadas con PvSYMRK-EGFP. (a) Imagen representativa de epidermis de raíces transgénicas de *P. vulgaris*. (b) El número de *puncta* fluorescentes se evaluó en imágenes 2D de epidermis de la zona de diferenciación en raíces transgénicas de *P. vulgaris* sin inocular, que expresan PvSYMRK-EGFP. Dado que el área/célula en las imágenes capturadas es variable, el número de *puncta* se normalizó por 1000 μm² de área celular. El valor promedio encontrado fue de 9 *puncta* /1000 μm² ± 0.3 SEM, n= imágenes de 64 células capturadas a partir de 29 raíces transgénicas. Las barras corresponden al valor promedio ± SEM (siglas en inglés de error estándar de la media). Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología-UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales. Tomado de Dávila-Delgado *et al.*, 2023, Anexo 6.

6.2 Efecto de inhibidores de tráfico vesicular sobre la distribución de PvSYMRK-EGFP en células epidermales tipo "nonhair" de raíces transgénicas

Para determinar el efecto de diferentes inhibidores del tráfico vesicular como BFA (100 μM), IKA (20 μM), TryA23 (50 μM) y CHX (50 μM) sobre la distribución subcelular de PvSYMRK-EGFP, se procedió a analizar cinéticas independientes de incubación de secciones de epidermis de raíces transgénicas en presencia del inhibidor en turno. La distribución de la fluorescencia de PvSYMRK-EGFP fue monitoreada durante 60-90 min, con apoyo de un microscopio confocal invertido de disco giratorio y se capturaron imágenes tipo "time-lapse" cada 10 min, como se ilustra en las figuras 6-11.

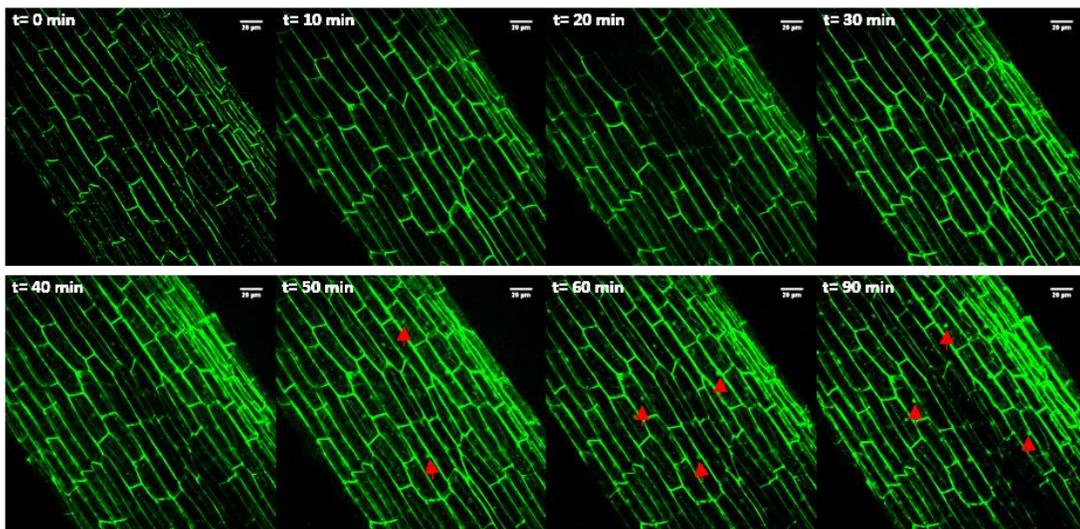


Figura 6. Imágenes representativas de la cinética de incubación con el inhibidor BFA (100 μM) en células de la epidermis de raíces transgénicas que expresan PvSYMRK-EGFP. Imágenes representativas de secciones de raíces transgénicas capturadas utilizando un microscopio confocal invertido de disco giratorio, en intervalos de 10 min tras la incubación con el inhibidor. Las flechas indican los cuerpos de BFA a los 50, 60 y 90 min *post*-incubación. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes capturadas fueron procesadas y analizadas utilizando el software Image J.

El número de *puncta* fluorescentes por 1000 μm^2 encontrados en cada célula antes del tratamiento (tiempo cero, $t=0$) se consideró como 100% y se usó para estimar los valores porcentuales relativos en esa célula en diferentes momentos del tratamiento.

En células vegetales, el inhibidor BFA (Brefeldina A) se ha utilizado ampliamente para visualizar la endocitosis de varios receptores membranales y transportadores en plantas, como BRI1, FLS2, BOR1, PIN1/PIN2 y FERONIA, ya que inhibe el tráfico de vesículas exocíticas *post*-TGN/EE y el reciclaje endosómico, proceso que ocurre sin afectar la actividad endocítica (Geldner *et al.*, 2001; Russinova *et al.*, 2004; Robatzek *et al.*, 2006; Geldner *et al.*, 2007; Dhonukshe *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2009; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Kasai *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012; Irani *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). Una característica notable del tratamiento con BFA es la coalescencia de vesículas en tránsito entre el TGN/EE y la membrana plásmática, lo que da lugar a estructuras subcelulares más grandes, conocidas como compartimentos inducidos por BFA (Geldner *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2009; Carluccio y Stavolonem, 2014; Ichikawa *et al.*, 2014). El tratamiento con BFA (100 μ M) en células de la epidermis de raíces transgénicas, provocó que el patrón punteado de *Pv*SYMRK-EGFP paulatinamente desapareciera (aproximadamente 40-60% a los 20-30 min *post*-incubación; Fig. 7).

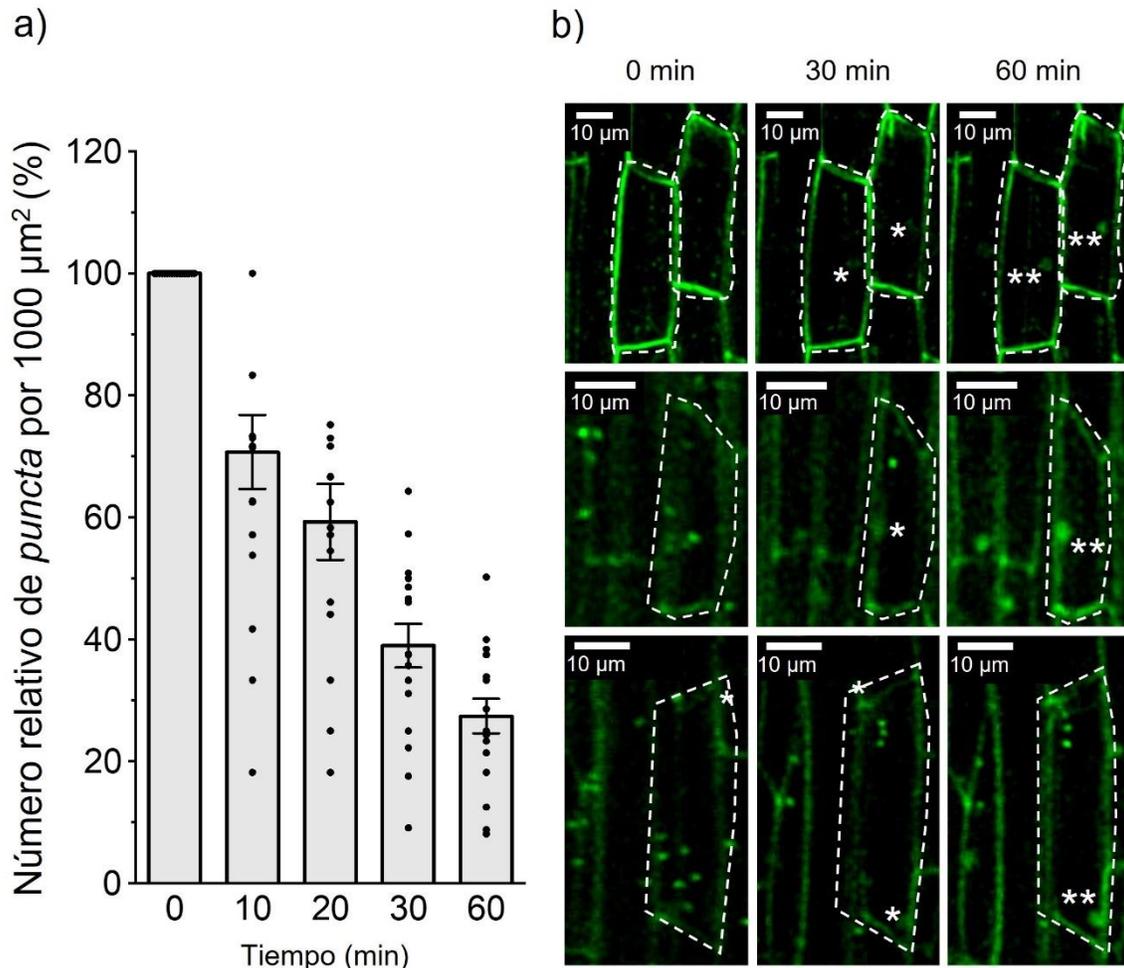


Figura 7. *PvsYMRK-EGFP* se acumula en compartimentos inducidos por BFA. (a) Para el cálculo del número relativo de *puncta* por 1000 μm^2 de área de cada célula analizada (%), se consideró como 100% al número de *puncta* fluorescentes por 1000 μm^2 encontrados la célula en análisis antes de iniciar tratamiento (tiempo cero, t=0 min; 10.84 ± 0.93 SEM, n=17 células, de 6 plantas de experimentos independientes). (b) Imágenes representativas de cuatro células epidermales independientes analizadas (enmarcadas con una línea discontinua). Los asteriscos indican la presencia de cuerpos de BFA. Las barras indican la media \pm SEM. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples (método de Tukey) indicaron una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.0001$. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales. Tomada de Dávila-Delgado *et al.*, 2023, Anexo 6.

A tiempos de incubación más prolongados (60-90 min *post-incubación*), los *puncta* se redujeron al 27% y se observó la acumulación de fluorescencia con un patrón tipo compartimento BFA (Fig. 7 b), similar a los patrones descritos en la literatura (Geldner *et al.*, 2001; Russinova *et al.*, 2004; Geldner *et al.*, 2007; Irani *et al.*, 2012;

Xue *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), lo que refuerza la observación de que los *puncta* de PvSYMRK-EGFP pudiera corresponder a la ocurrencia de alguna forma de tráfico vesicular. Aparentemente, la fluorescencia asociada a la membrana plasmática no sufrió cambios durante la incubación con BFA.

Por otro lado, se evaluó el efecto del inhibidor endocítico IKA (20 μ M) en la distribución subcelular de PvSYMRK-EGFP en células de la epidermis de raíces transgénicas. Aunque el uso de IKA para estudiar la actividad endocítica en células vegetales no es tan extenso como en células animales, se ha establecido que IKA bloquea la maduración y/o el pinzamiento de las vesículas recubiertas de clatrina de la membrana plasmática vegetal sin afectar la función interna del tráfico de vesículas (Moscatelli *et al.*, 2007; Onelli *et al.*, 2008; Elkin *et al.*, 2016).

Si bien en las imágenes capturadas a diferentes tiempos (Fig. 8), el efecto inhibitorio de IKA es apenas perceptible a simple vista. No obstante, el análisis cuantitativo mostró una tendencia a disminuir el número de *puncta*, marcados con PvSYMRK-EGFP, en función del tiempo de incubación con el inhibidor (Fig. 8). A tiempos de 20-30 min, se alcanzó una disminución del 40%, mientras que, a tiempo más largos de 60 min, se cuantificó una disminución del 32%. Ya que IKA es un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, este resultado sugiere que una parte de los *puncta* puede corresponder a vesículas endocíticas.

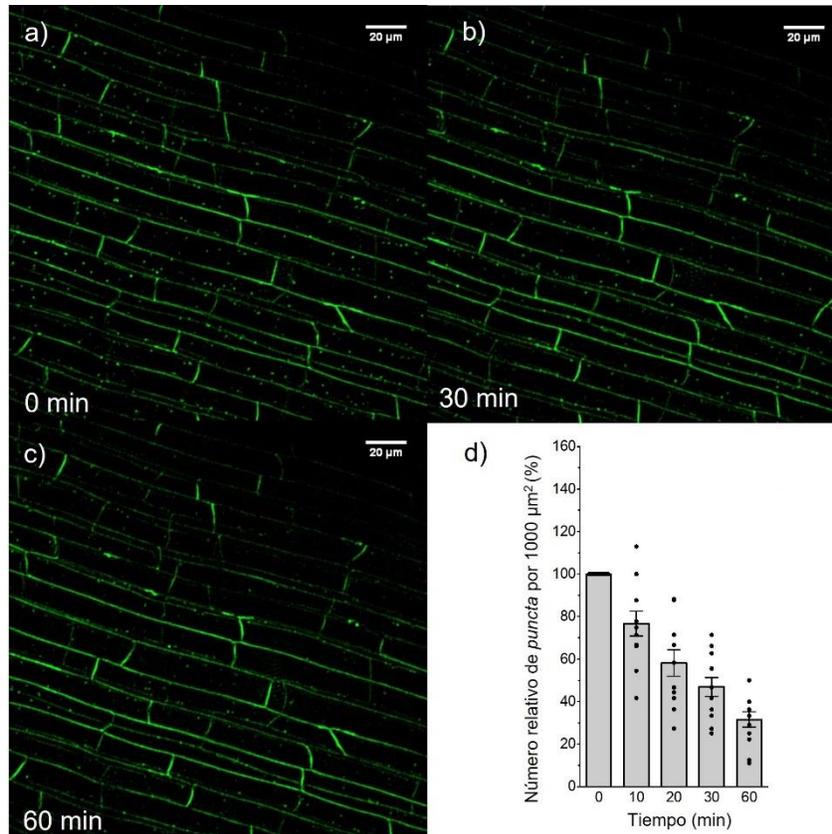


Figura 8. La densidad de *puncta* que contienen PvSYMRK-EGFP se reduce en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis IKA 20 μM (ikarugamicina). (a-c) Las imágenes confocales de la epidermis de la raíz transgénica de *P. vulgaris* que expresan PvSYMRK-EGFP se capturaron a diferentes tiempos para determinar el efecto del inhibidor con respecto al número relativo de *puncta* por 1000 μm² (%) de área en células epidermales. (d) Cuantificación de *puncta* en las células tratadas con IKA, el 100% corresponde al valor de *puncta* por 1000 μm² en t=0 (IKA, 7.74±0.69, n=12 células). Los datos presentados provienen de 3-4 plantas de experimentos independientes. Las barras indican la media ± SEM. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples (método de Tukey) mostró una diferencia estadística en $P < 0.001$. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I (Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales.

Otro inhibidor utilizado para la caracterización de los *puncta* en raíces que expresan PvSYMRK-EGFP es Tirfostina A23 (TyrA23), un inhibidor de endocitosis mediada por clatrina. TyrA23 se ha utilizado ampliamente para probar la endocitosis de cargos de la membrana plasmática. Su efecto inhibitor se basa en la interrupción de la endocitosis dependiente de clatrina mediante el bloqueo de la interacción entre la subunidad μ2 del complejo adaptador AP2 y un cargo de la membrana plasmática (Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012; Irani *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Estas

interacciones están mediadas por señales de endocitosis, como el motivo lineal YXXØ, que está presente en los dominios citosólicos de las proteínas transmembranales (Banbury *et al.*, 2003; Sorkin, 2004; Ortiz-Zapater *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2008; Traub y Bonifacino, 2013; Liu *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos en el análisis por microscopía indican que las raíces transgénicas incubadas con TyrA23 (50 µM) presentan una disminución paulatina de los *puncta*, mientras que aparentemente, la fluorescencia asociada a la membrana plasmática aumenta (Fig. 9). Se alcanzó una reducción de aproximadamente 40-50% después de 20-30 min de tratamiento con TyrA23 (Fig. 9 d), alcanzando los valores más bajos en el punto de tiempo de 60 min (27%). Estos resultados refuerzan la noción de que *PvSYMRK-EGFP* puede participar en la ruta endocítica dependiente de clatrina.

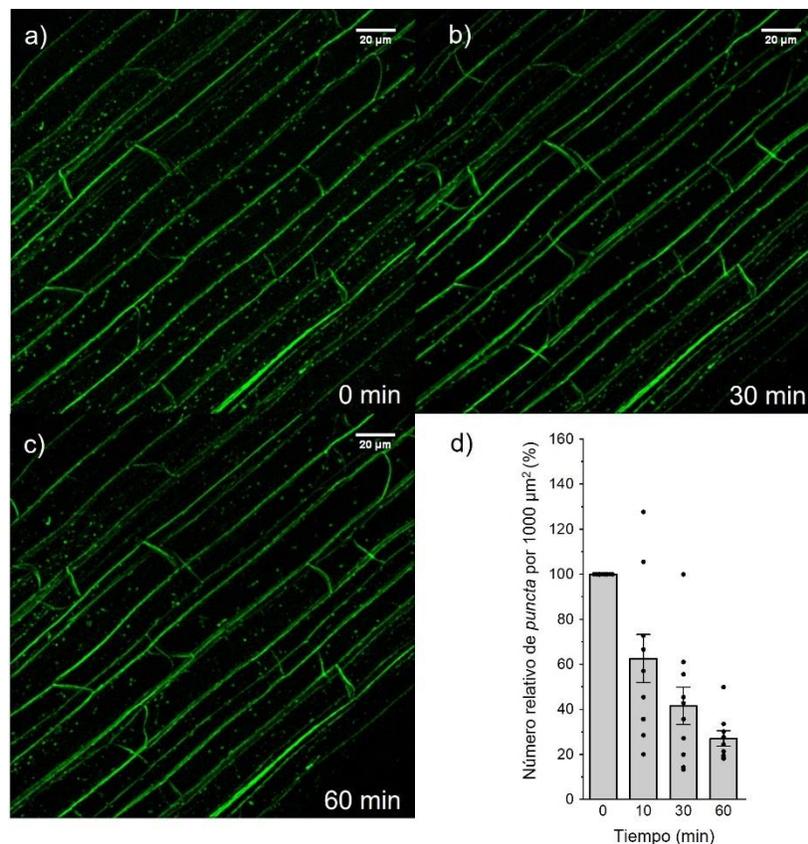


Figura 9. La densidad de *puncta* que contienen *PvSYMRK-EGFP* disminuye en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis TyrA23 50 µM (Tirfostina A23). (a-c) Las imágenes confocales de la epidermis de la raíz transgénica de *P. vulgaris* que expresan *PvSYMRK-EGFP* se capturaron a diferentes tiempos para determinar el efecto del inhibidor

con respecto al número relativo de *puncta* por 1000 μm^2 (%) de área en células epidermales. (d) Cuantificación de *puncta* en las células tratadas con TyrA23, el 100% corresponde al valor de *puncta* por 1000 μm^2 en $t=0$ (TyrA23, 7.94 ± 0.48 , $n=10$ células). Los datos son de 3-4 plantas de experimentos independientes. Las barras indican la media \pm SEM. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples (método de Tukey) mostró una diferencia estadística en $P < 0.001$. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales.

Para corroborar el efecto específico de TyrA23 sobre la endocitosis mediada por clatrina en plantas se utiliza, como control negativo, un compuesto análogo que no posee actividad inhibitoria sobre endocitosis, Tyr51. Este compuesto fue utilizado a la misma concentración que TyrA23 (50 μM) sobre la raíz de plantas transgénicas que expresan *PvSYMRK-EGFP*. El análisis minucioso de las células de la epidermis y del córtex, tratadas con Tyr51, no mostró cambios significativos sobre el número de *puncta* a lo largo de 1 hora de análisis (Fig. 10), esto confirma la especificidad del efecto de TyrA23 sobre la disminución del patrón punteado de *PvSYMRK-EGFP*.

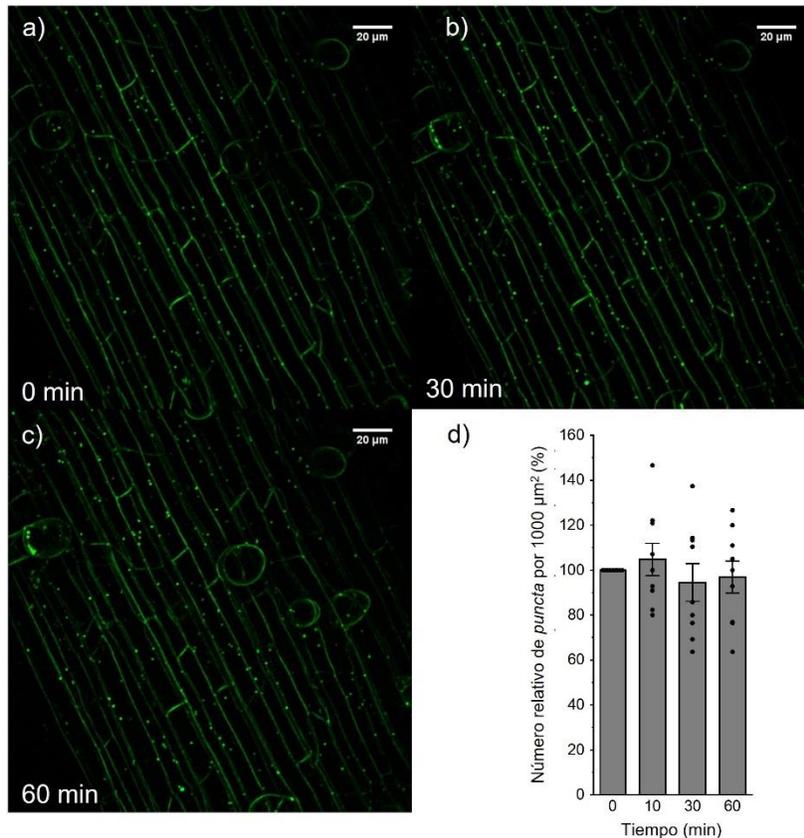


Figura 10. La densidad de *puncta* que contienen *PvSYMRK-EGFP* no cambia en células epidermales tratadas con el inhibidor de endocitosis Tyr51 50 μM (Tirfostina 51). (a-c) Las imágenes confocales de la epidermis de la raíz transgénica de *P. vulgaris* que expresan *PvSYMRK-EGFP* se capturaron a diferentes tiempos para determinar el efecto del inhibidor con respecto al número relativo de *puncta* por 1000 μm^2 (%) de área en células epidermales. (d) Cuantificación de *puncta* en las células tratadas con Tyr51, el 100% corresponde al valor de *puncta* por 1000 μm^2 en $t=0$ (Tyr51, 12.28 ± 0.99 $n=9$ células). Los datos son de 3-4 plantas de experimentos independientes. Las barras indican la media \pm SEM. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples (método de Tukey) no mostró una diferencia estadística en $P < 0.001$, ($P = 0.37$). Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I (Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales.

Continuando con la caracterización de los *puncta* de *PvSYMRK-EGFP*, se consideró importante analizar si alguna fracción de los *puncta* observados pudiera estar relacionado con el transporte de la proteína *PvSYMRK-EGFP* sintetizada *de novo*. Es decir, en tránsito por la ruta secretoria, entre retículo endoplásmico - aparato de Golgi - membrana plasmática, y no proveniente de un evento endocítico.

Con este propósito, raíces transgénicas que expresan *PvSYMRK-EGFP* fueron incubadas en presencia de 50 μM de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis

de proteínas en células eucariontes. El análisis mostró que durante los primeros 20 min de incubación no hay un cambio aparente en el patrón de *puncta* asociado a PvSYMRK-EGFP, sin embargo, a partir de 30-40 min *post*-incubación con CHX se observa una clara tendencia a disminuir (54 y 44% respectivamente) el número de *puncta* (Fig. 11), sin que el patrón desaparezca por completo.

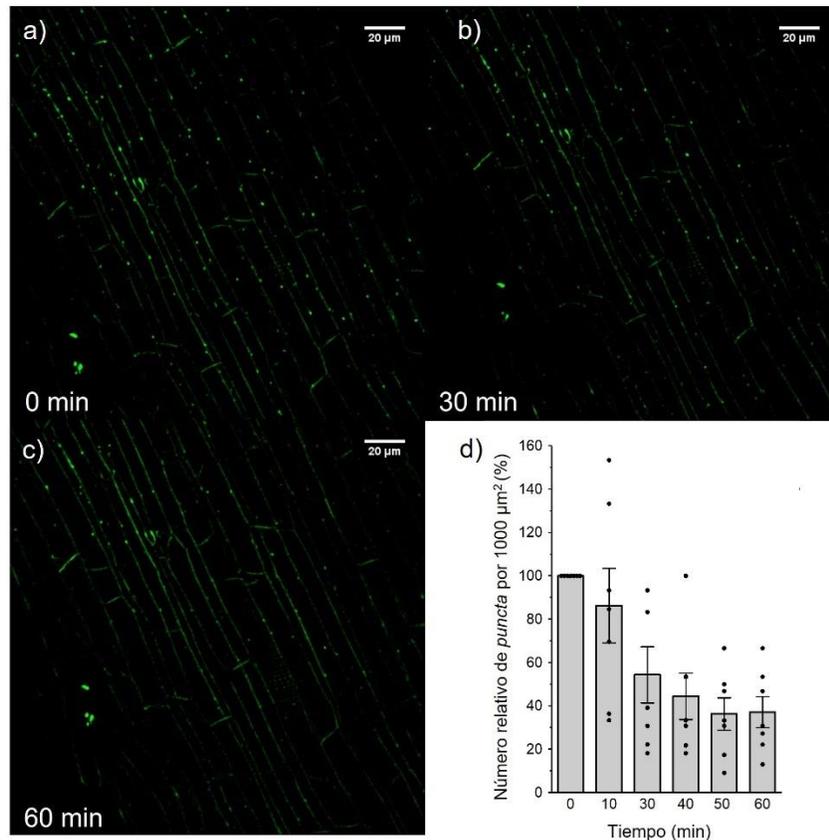


Figura 11. La densidad de *puncta* que contienen PvSYMRK-EGFP se reduce en células epidermales tratadas con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHX 50 µM (cicloheximida). (a-c) Las imágenes confocales de la epidermis de la raíz transgénica de *P. vulgaris* que expresan PvSYMRK-EGFP se capturaron a diferentes tiempos para determinar el efecto del inhibidor con respecto al número relativo de *puncta* por 1000 µm² (%) de área en células epidermales. (d) Cuantificación de *puncta* en las células tratadas con CHX, el 100% corresponde al valor de *puncta* por 1000 µm² en t=0 (CHX, 7.72±0.68, n=7 células). Los datos son de 3-4 plantas de experimentos independientes. Las barras indican la media ± SEM. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples (método de Tukey) mostró una diferencia estadística en P < 0.001. Imágenes capturadas utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I (Zeiss Observer Z.1 tipo invertido (LNMA, Instituto de Biotecnología - UNAM). Las imágenes están editadas con el software Image J, pero la cuantificación se hizo sobre las imágenes originales.

Por lo tanto, dos poblaciones de *puncta* fluorescentes parecen estar presentes en las células epidermales tipo "*nonhair*": un grupo (de aproximadamente el 60% de

los *puncta*) sensible a CHX, involucrado en el transporte de PvSYMRK-EGFP recién sintetizado, y un grupo menor resistente a CHX, que puede corresponder a *puncta* enriquecidos en PvSYMRK-EGFP en tránsito entre la membrana plasmática y el compartimento TGN/EE (red *trans*-Golgi/endosoma temprano) o reciclando hacia la membrana plasmática. Es relevante notar que la fluorescencia de PvSYMRK-EGFP en la membrana plasmática no se vió afectada por el tratamiento con los inhibidores BFA, IKA, TyrA23 y CHX (Fig. 12), lo que pudiera estar reflejando una baja tasa de recambio de PvSYMRK-EGFP en estas células.

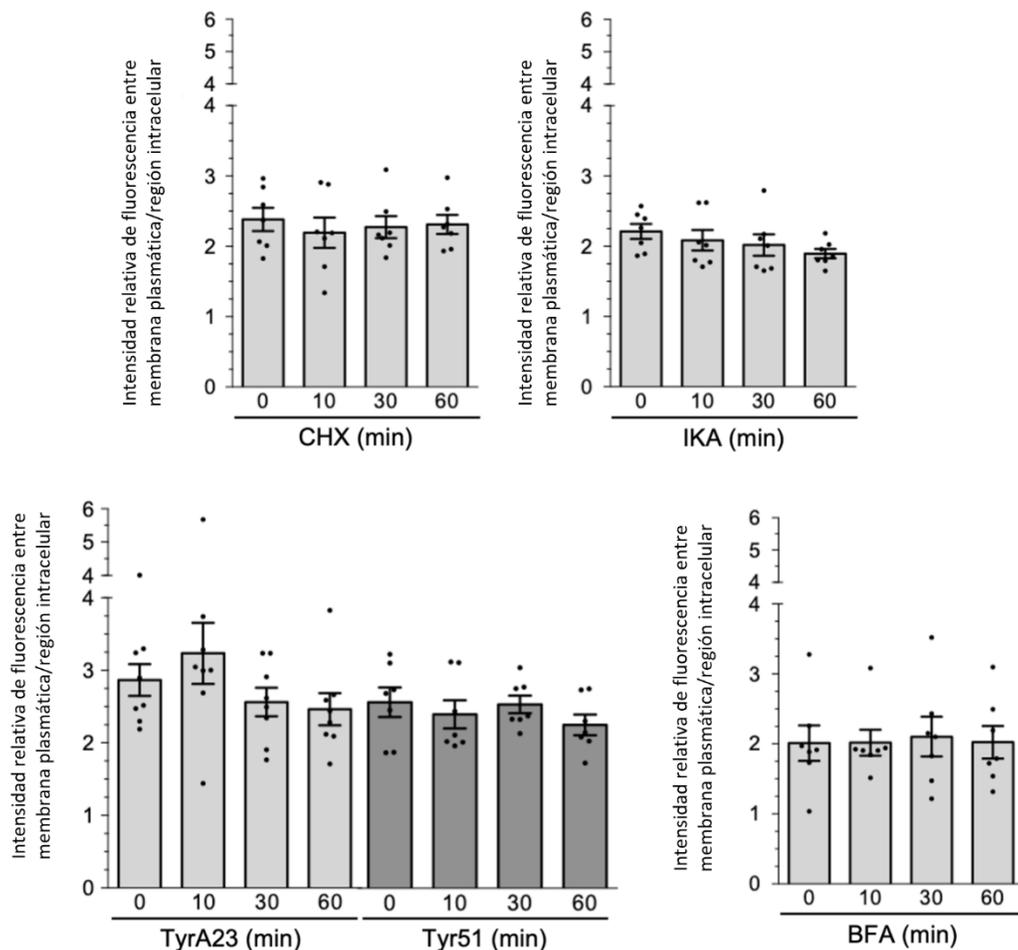


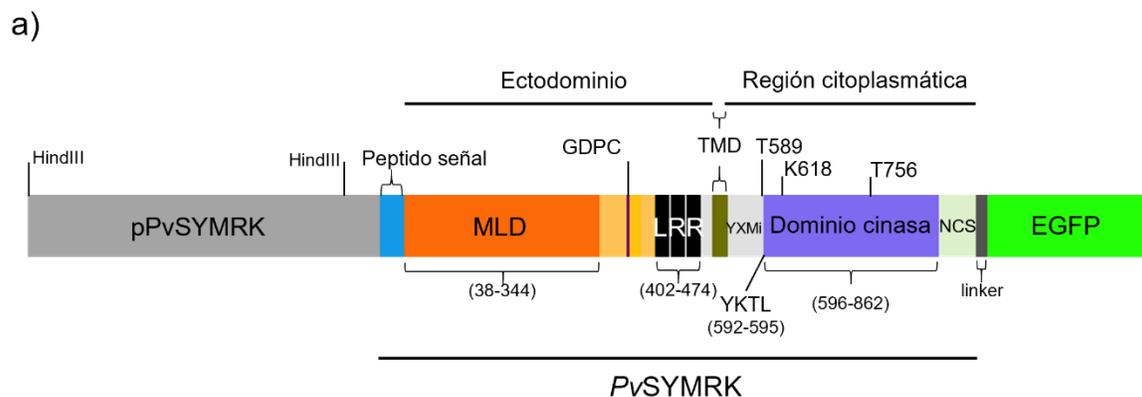
Figura 12. La señal de PvSYMRK-EGFP en la membrana plasmática de células epidermales tipo "*nonhair*" no se ve afectada por el tratamiento con inhibidores de endocitosis, tráfico vesicular y síntesis de proteínas. La intensidad de fluorescencia relativa intracelular de la membrana plasmática se determinó como lo describen Luo y Russinova (2017). Los datos provienen de células representativas tratadas con inhibidores CHX (ciclohexamida), IKA (ikarugamicina), Tyr A23 (tirfostina A23), Tyr51 (tirfostina 51) y BFA

(brefeldina A), como se describe en las Figuras 6-11. Los valores y las barras son valores medios en + SEM, n=7 células. El análisis ANOVA unidireccional de varianza en rangos y comparaciones múltiples no mostró diferencias estadísticas significativas.

Es fundamental recordar que, hasta este punto, el efecto de inhibidores de tráfico vesicular ha sido evaluado en células epidermales tipo "*nonhair*" de raíces transgénicas no inoculadas con bacteria simbiótica alguna, ni incubadas con algún elictor simbiótico (como los factores Nod). Por lo que el efecto inhibitorio observado corresponde a la dinámica del receptor quimérico *PvSYMRK-EGFP* en un estado celular basal ("*steady state*") de endocitosis constitutiva. Resta analizar el efecto de estos inhibidores en raíces transgénicas inoculadas con *R. tropici* o *R. etli*, u otro tipo de simbiote como las micorrizas y determinar si afecta las características del patrón punteado y la posible endocitosis *PvSYMRK-EGFP*.

6.3 Efecto de las mutaciones T589A, K618E y Δ YKTL en la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP*

El análisis de la relación estructura-función de RLKs de plantas (por ejemplo, FLS2, BRI1y BAK1) y transportadores transmembranales BOR1 y PIN, entre otros, demostró que residuos treonina (T) y del motivo tipo YXX Φ , presentes en la región yuxtamembranal intracelular (YXMi), tienen un papel central en la actividad de autofosforilación y endocitosis de este tipo de receptores (Robatzek *et al.*, 2006; Geldner *et al.*, 2007; Gruszka 2013). En el caso de SYMRK, en un estudio *in vitro* se demostró que el residuo T593 de la región YXMi de *LjSYMRK* (T589 en *PvSYMRK*, Fig. 13) está asociado a su actividad de autofosforilación (Yoshida y Parniske, 2005). Por otro lado, al analizar la estructura primaria de diferentes proteínas SYMRK se identificó la secuencia YKTL (residuos 592-595 en *PvSYMRK*, Fig.13), un potencial motivo tipo marcaje ("*sorting*" en inglés) de internalización o endocitosis (Banbury *et al.* 2003; Robatzek *et al.* 2006; Geldner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2020).



b)

	TMD		
<i>M. truncatula</i>	SLINTDYGRCKAKKPKFGQVFVIGAITSGSLITLAVGILFFCRYRHKSTITLEGF-GKTY	560	
<i>L. japonicus</i>	SLINTDYGRCKGKESRFQVIVIGAITCGSLLITLAFGVLFVCRYRQKLIPEWEGFAGKKY	558	
<i>P. vulgaris</i>	SLINTDYGRCKAKEPRFGQVFVIGAITCGSLLITVAVGIIFVCRYRQKLIPEWEGFGGKNY	554	
<i>G. max</i>	SPINTDYGRCKGKEPRFGQVFVIGAITCGSLLITLAVGIIFVCRYRQKLIPEWEGFGGKNY	554	
	Región yuxtamembranal intracelular (YXMi)		*
<i>M. truncatula</i>	PMATNIIIFSLPSKDDFFIKSVSVKPFPTLEYIEQATEQYKTLIGEGGFGSVYRGTLDGQE	620	
<i>L. japonicus</i>	PMETNIIIFSLPSKDDFFIKSVSIQAFPTLEYIEVATERYKTLIGEGGFGSVYRGTLDGQE	618	
<i>P. vulgaris</i>	LMETNVIFSLPSKDDFLIKSVSIQFTTLEDIEVATERYKTLIGEGGFGSVYRGTLDGQE	614	
<i>G. max</i>	LMETNVIFSLPSKDDLLIKSVSIOTFTLEDIEVATERYKTLIGEGGFGSVYRGTLDGQE	614	
	**	T589A ΔYKTL	
<i>M. truncatula</i>	VAVKVRSSSTSTQGTREFDNELNLLSAIQHENLVPLLGYCNEYDQOILVYPFMSNGSLDR	680	
<i>L. japonicus</i>	VAVKVRSSATSTQGTREFDNELNLLSAIQHENLVPLLGYCNESDQOILVYPFMSNGSLQDR	678	
<i>P. vulgaris</i>	VAVKVRSSATSTQGTREFDNELNLLSAIQHENLVPLLGYCNENDQOILVYPFMSNGSLQDR	674	
<i>G. max</i>	VAVKVRSSATSTQGTREFDNELNLLSAIQHENLVPLLGYCNENDQOILMYPFMSNGSLQDR	674	
	K618E		
<i>M. truncatula</i>	LYGEASKRKILDWPTRLSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDQSMCAKQAD	740	
<i>L. japonicus</i>	LYGEPAKRKILDWPTRLSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDIKSSNILLDHSMAKQAD	738	
<i>P. vulgaris</i>	LYGEPAKRKILDWPTRLSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDHSMAKQAD	734	
<i>G. max</i>	LYGEPAKRKILDWPTRLSIALGAARGLAYLHTFPGRSVIHRDVKSSNILLDHSMAKQAD	734	
<i>M. truncatula</i>	FGFSKYAPQEGDSYVSLEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLEIVSGREPLN	800	
<i>L. japonicus</i>	FGFSKYAPQEGDSYVSLEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLEIVSGREPLN	798	
<i>P. vulgaris</i>	FGFSKYAPQEGDSNVSLEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSYGVVLEIVTGREPLD	794	
<i>G. max</i>	FGFSKYAPQEGDSNVSLEVRGTAGYLDPEYYKTQQLSEKSDVFSFGVVLEIVSGREPLD	794	
	T756A		

Figura 13. Representación de pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP y alineamiento de fragmento de secuencias. (a) Representación esquemática del cassette de expresión pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP en el que se indica la posición de los residuos sustituidos y el tetrapéptido YKTL. pPvSYMRK, secuencia promotora (1622 pb); PvSYMRK, polipéptido de 919 residuos de aminoácidos que constituyen la proteína PvSYMRK; MLD, dominio tipo malectina; LRR, región con repeticiones ricas en leucina; TMD, dominio transmembranal; YXMi, yuxtamembranal intracelular; NCS, secuencia no conservada; EGFP, secuencia peptídica de GFP en fusión con PvSYMRK. (b) Alineamiento de fragmento de secuencias en aminoácidos de *Medicago truncatula* DMI2 (Medtr5g030920), *Lotus japonicus* SYMRK (AF492655), *Phaseolus vulgaris* SYMRK (Phvul.002G143400) y *Glycine max* SYMRK (Glyma01g02451). Se indican las secuencias TMD (línea verde), YXMi (línea negra), el sitio

de unión a ATP (línea azul, marcada con un asterisco) presente en el dominio I y el motivo de fosfotransferencia VAVK (línea azul, marcada con dos asteriscos). Los residuos que fueron sustituidos o eliminados en este estudio están enmarcados en rojo.

De donde, para explorar las funciones del "fosfo-código" del residuo T589, del tetrapéptido YKTL y del residuo catalítico K618 (equivalente a K622 y K625 en *Lj*SYMRK y *Ah*SYMRK, respectivamente, Fig. 13) en la endocitosis de *Pv*SYMRK, se generaron las versiones mutadas *Pv*SYMRK(T589A)-EGFP (no fosforilable), *Pv*SYMRK(Δ YKTL)-EGFP y *Pv*SYMRK(K618E)-EGFP (con pérdida de actividad cinasa o cinasa muerta/inactiva, KD por sus siglas en inglés *kinase death*).

Al analizar las células epidermales tipo "*nonhair*" en las raíces transgénicas que expresan las versiones mutadas de *Pv*SYMRK-EGFP, se encontró que el número de estructuras *puncta* es inferior al observado en las raíces control que expresan la versión tipo silvestre de *Pv*SYMRK-EGFP (Fig. 14). Como información complementaria a los resultados descritos, se reporta que la serie de mutaciones propuestas a evaluar incluía la sustitución T756A, equivalente a *Lj*SYMRK T760A, potencialmente involucrada en la activación de SYMRK dependiente de fosforilación. Sin embargo, y aún cuando se han utilizado 15 clones independientes de *A. rhizogenes* K599 que portan una de las dos construcciones pK2GW7-p*Pv*SYMRK::*Pv*SYMRK(T756A)-EGFP-p35S::*LifeAct-mTurquoise2* generadas, no se logró la obtención de las raíces pilosas correspondientes.

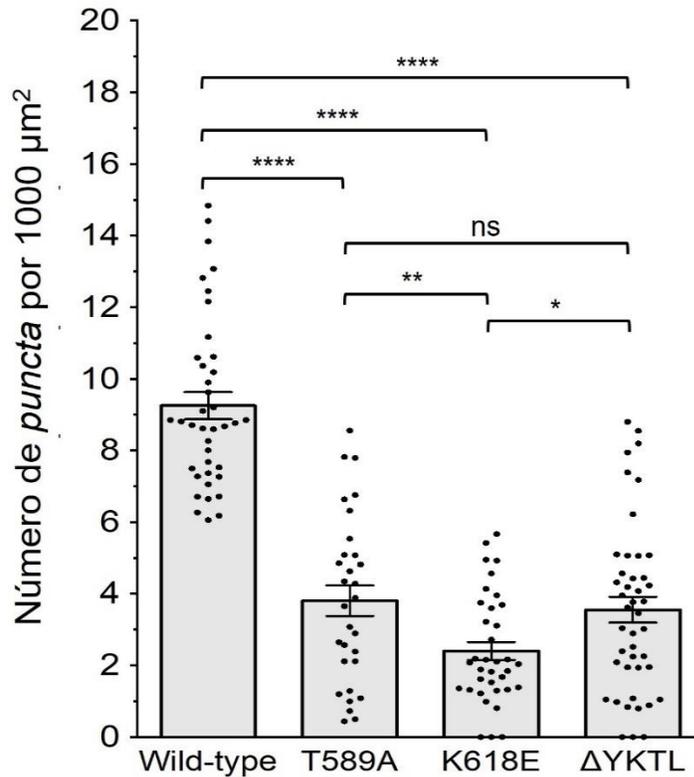


Figura 14. Las mutaciones T589A, K618E y Δ YKTL afectan la endocitosis constitutiva de PvSYMRK-EGFP. En PvSYMRK, el residuo T589 ocupa la posición que corresponde al residuo T593 en LjSYMRK, asociado a su actividad de autofosforilación y es parte del "fosfo-código" que regula la actividad cinasa de SYMRK. La mutación T589A es no fosforilable. K618, equivalente al residuo K622 en LjSYMRK, es un residuo catalítico conservado, presente en el motivo VAVK involucrado en la fosfotransferencia en SYMRK. Las mutaciones fosfomímicas como K618E inactivan la actividad de la cinasa SYMRK generando una cinasa muerta/inactiva (*kinase dead* o KD, en inglés). El tetrapéptido YKTL está conservado en las proteínas SYMRK. Es un motivo tipo YXXØ, de marcaje de proteínas con actividad endocítica, está conservado en varios de los receptores de plantas que son endocitados. Las versiones mutantes y de tipo silvestre de PvSYMRK-EGFP se expresaron individualmente en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Se reporta el número de *puncta* fluorescentes en células epidermales. El promedio en el número de *puncta* por 1000 $\mu\text{m}^2 \pm$ SEM son como sigue: de tipo silvestre, PvSYMRK-EGFP, 9.25 ± 0.38 , n= 39 células; T593A, PvSYMRK(T593A)-EGFP, 3.8 ± 0.43 , n= 30 células; K618E, PvSYMRK(K618E)-EGFP, 2.4 ± 0.25 , n= 36 células; Δ YKTL, PvSYMRK(Δ YKTL)-EGFP, 3.6 ± 0.36 , n= 44 células. Los valores son de 3-6 plantas de experimentos independientes. Los valores y las barras son la media \pm SEM. El análisis ANOVA unidireccional *post hoc* de comparaciones múltiples (método de Tukey) mostró una diferencia estadísticamente significativa (****, $P < 0.0001$), (**, $P < 0.01$), (*, $P < 0.05$) respecto a la muestra control ("*wild-type*"). ns, no hay diferencia significativa, $P > 0.05$.

6.4 Endocitosis de PvSYMRK-EGFP en pelos radicales de *P. vulgaris* en respuesta a la inoculación con rhizobia.

Previo a la evaluación del efecto de la inoculación con rhizobia sobre la distribución de PvSYMRK en pelos radicales, establecimos un protocolo para distinguir los pelos radicales que responden a la bacteria de los que no responden. Con este fin, se tomó ventaja de las propiedades de unión a actina (fragmento LifeAct) de la proteína quimérica fluorescente, LifeAct-mTurquoise2, un excelente marcador del perfil de citoesqueleto de actina (Vidali *et al.*, 2009), coexpresado con PvSYMRK-EGFP en raíces transgénicas. Los pelos radicales que no responden tienen el mismo aspecto que los pelos radicales de raíces no inoculadas, lo que significa que son células alargadas con un flujo citoplasmático típico en la región subapical y presentan haces finos de filamentos de actina, en este caso etiquetados con LifeAct-mTurquoise2, y fácilmente visibles por microscopia confocal, como se describió anteriormente (Cárdenas *et al.*, 1998; Sieberer y Emons, 2000; Yokota *et al.*, 2009). Mientras que los pelos radicales que responden a *R. etli* CE3 pMP604 (cepa caracterizada por Dávila-Delado *et al.*, 2020; ver Anexo 5) se identificaron por la hinchazón de la punta del pelo radical y una señal LifeAct-mTurquoise2 (Fig. 15) que se asemeja a la acumulación de filamentos de actina fragmentados observados en la zona apical/subapical del pelo radical, una respuesta típica en tratamiento con rhizobia y factores Nod (Cárdenas *et al.*, 1998; Maekawa-Yoshikawa y Murooka, 2009; Yokota *et al.*, 2009). Ambos cambios preceden a la activación de SYMRK y la señalización río abajo (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Miwa *et al.*, 2006; Kosuta *et al.*, 2011).

Con respecto a su distribución subcelular en los pelos radicales de raíces transgénicas no inoculadas con rhizobia, la señal fluorescente de PvSYMRK-EGFP se detectó asociada con la membrana plasmática apical en un patrón punteado discreto, similar al descrito al caracterizar DMI2 (Riely *et al.*, 2013). También, se observaron uno o dos *puncta* marcados con PvSYMRK-EGFP, dispersos en el citoplasma en la zona apical de los pelos radicales (Fig. 15). Por el contrario, en los pelos radicales que responden a *R. etli* CE3 pMP604, la señal fluorescente de

PvSYMRK-EGFP desapareció de la membrana plasmática del pelo radical y se encontró un número significativamente mayor de *puncta* marcados con *PvSYMRK-EGFP* por pelo radical (Fig. 15 a, b). Este resultado es consistente con el efecto observado en la distribución de DMI2-GFP en los pelos radicales de *M. truncatula* tratados con factores Nod (Riely *et al.*, 2013).

Por otro lado, el mecanismo que media la endocitosis inducida de *PvSYMRK-EGFP* parece estar asociado a la cascada de señalización activada por los factores Nod ya que la incubación de las raíces de *P. vulgaris* con la cepa *R. etli* CE3 CFNX89, incapaz de sintetizar factores Nod (Brom *et al.*, 1992; Corvera *et al.*, 1999), no altera el patrón de distribución de *PvSYMRK-EGFP* (Fig. 15 a, b).

En conjunto, los datos obtenidos son evidencia sólida que indica la inducción de la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* en los pelos radicales que responden a rhizobia. Este patrón también se reportó para FLS2 y BOR1 (Takano *et al.*, 2005; Robatzek *et al.*, 2006) con sus respectivos elicitores.

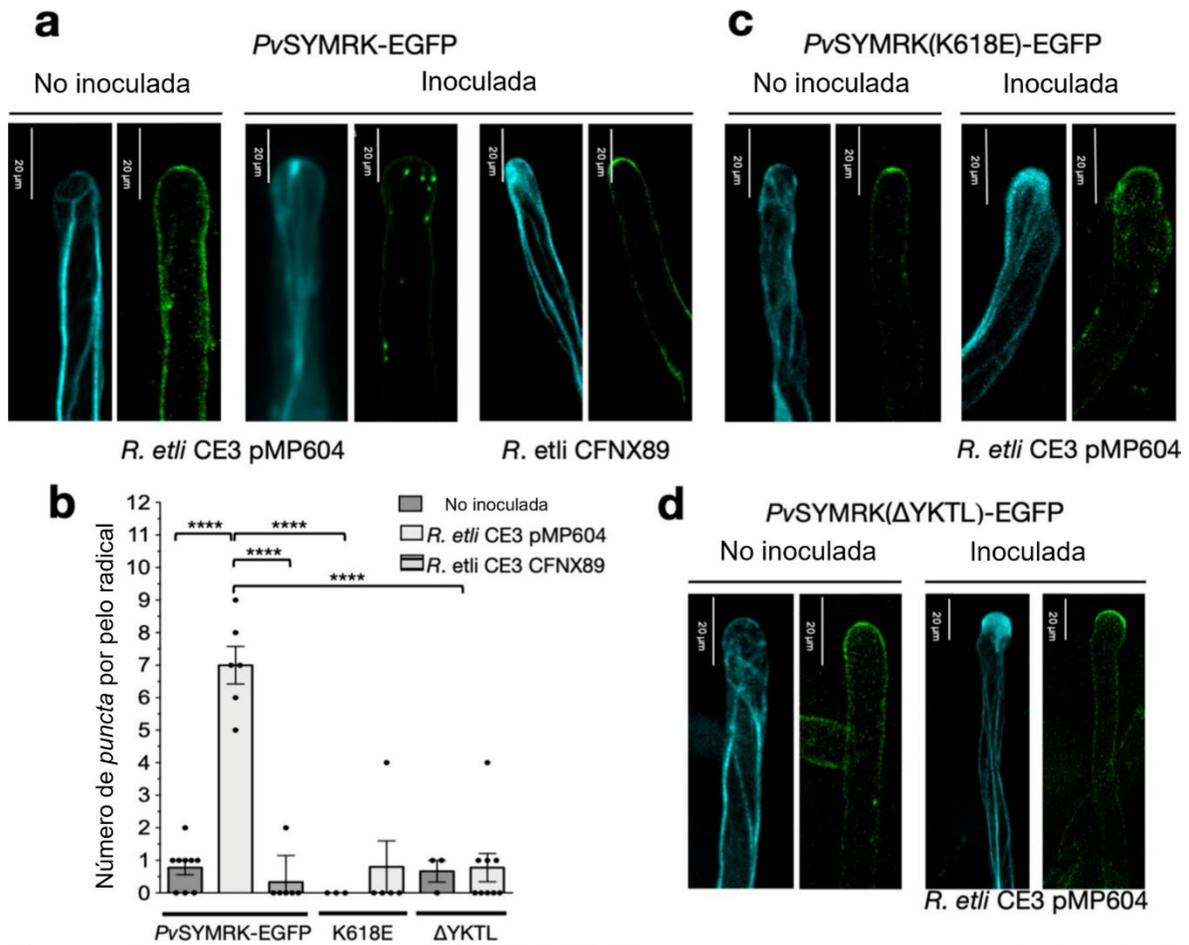


Figura 15. La endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* se induce en los pelos radicales de *P. vulgaris* que responden a la inoculación de *R. etli*. (a, c y d) Imágenes representativas de pelos radicales de raíces transgénicas que expresan la versión no mutada de *PvSYMRK-EGFP* (a), *PvSYMRK(K618E)-EGFP* (c) o *PvSYMRK(ΔYKTL)-EGFP* (d). (b) gráfica del número de *puncta* fluorescentes presentes en los pelos radicales analizados. (a, c y d) fluorescencia de versiones quiméricas de *PvSYMRK-EGFP* no mutada o con mutaciones K618E o Δ YKTL (en verde). LifeAct-Turquoise2 (en cian) es un reportero quimérico fluorescente, de unión a actina, es una herramienta útil para identificar los pelos radicales que responden a rhizobia. Es decir, la respuesta a rhizobia, además de presentar una hinchazón en el ápice del pelo radical, incluye el típico rearrreglo en el citoesqueleto, caracterizado por la acumulación de actina fragmentada en la zona apical/subapical del pelo radical radical. En los pelos radicales no inoculados o que no responden a rhizobia, los filamentos de actina se ensamblan como haces finos a lo largo del pelo radical y alcanzan la punta apical. (a) En los pelos radicales de raíces no inoculadas, *PvSYMRK-EGFP* (tipo silvestre, en verde) está asociado, principalmente, a la membrana plasmática apical del pelo radical y, ocasionalmente se observa una estructura tipo *puncta* fluorescente (0.78 ± 0.22 , $n = 9$ pelos radicales, de 7 plantas independientes). En los pelos radicales que responden a *R. etli* CE3 pMP604, *PvSYMRK-EGFP* desaparece de la membrana plasmática y se observa un mayor número de *puncta* fluorescentes (7 ± 0.6 , $n=6$ pelos radicales, de 4 plantas independientes), lo que indica que rhizobia induce la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP*. La inoculación con la *R. etli* CFNX89 (Brom *et al.*, 1992; Corvera *et al.*, 1999), incapaz de producir factores Nod, no conlleva la hinchazón del ápice del pelo radical, ni la inducción de

la endocitosis de PvSYMRK-EGFP, pero sí un rearrreglo del cicloesqueleto de actina. (b, c y d) La inoculación con *R. etli* CE3 pMP604 no induce un aumento en el número de *puncta* fluorescentes observados en los pelos radicales que expresan PvSYMRK(K618E)-EGFP o PvSYMRK(Δ YKTL)-EGFP. (b) El número de *puncta* fue cuantificado y graficado como previamente se describió. (c) La actividad endocítica no se induce en respuesta a rhizobia en pelos radicales que expresan PvSYMRK(K618E)-EGFP (sin inocular, 0 *puncta*, n=3 pelos radicales; inoculados, 0.8 ± 0.8 , n=5 pelos radicales) o (d) PvSYMRK(Δ YKTL)-EGFP (sin inocular, 0.67 ± 0.33 , n=3 pelos radicales; inoculados, 0.78 ± 0.43 pelos radicales). Se capturaron imágenes de pelos radicales de raíces transgénicas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* CE3 pMP604 o *R. etli* CFNX89 a 3 dpi. Los valores y las barras son medias \pm SEM). El análisis ANOVA unidireccional de varianzas en rangos y comparaciones múltiples mostró una diferencia estadística (método de Tukey) en $P < 0.0001$ (****), $P > 0.05$ (ns).

Un análisis similar se efectuó en pelos radicales que expresan las versiones mutantes de PvSYMRK(K618E)-EGFP y PvSYMRK(Δ YKTL)-EGFP, en los que no se observó el patrón de respuesta con la versión no mutada de PvSYMRK-EGFP. Estos pelos radicales responden a rhizobia, y las proteínas PvSYMRK(K618E)-EGFP y PvSYMRK(Δ YKTL)-EGFP se incorporan y permanecen asociadas a la membrana plasmática del pelo radical, pero no se presenta un aumento significativo en el número de *puncta* intracelulares fluorescentes (Fig. 15 b, c, d). Esto refuerza los resultados antes descritos que indican que la inducción de la endocitosis de PvSYMRK-EGFP es específica de la respuesta a rhizobia, es dependiente de su actividad cinasa y requiere de la presencia del motivo endocítico tipo YXX \emptyset , el tetrapéptido YKTL.

7.- DISCUSIÓN

El gen *SYMRK/DMI2/NORK*, y sus potenciales ortólogos en angiospermas, codifica para un receptor tipo cinasa, con dominios ricos en leucina, cuya expresión y función es específica de raíz y resulta esencial en las interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos (Markmann *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2020; Vasan *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022; Miyata *et al.*, 2023). Sin embargo, a pesar de sus funciones relevantes en estos modelos biológicos, los procesos celulares que vinculan la activación de SYMRK con la subyacente cascada de señalización asociada a este receptor aún no han sido descritos.

Para contribuir a la comprensión de los mecanismos celulares implicados en la regulación de la actividad de SYMRK, en este proyecto de tesis se aplicó un enfoque basado en la visualización de la dinámica subcelular de la quimera *PvSYMRK-EGFP* en células epidermales de la raíz de *P. vulgaris* (Figuras 4-15). La estrategia empleada combinó el uso de inhibidores, de mutagénesis sitio-específica y microscopía confocal. Los resultados obtenidos demuestran que rhizobia induce la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* en pelos radicales de *P. vulgaris*. Mientras que en las células epidermales tipo “*nonhair*” de raíces no inoculadas, la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* es constitutiva. Además, proporcionamos información sobre el papel desempeñado por el “fosfo-código” del residuo T589, la actividad cinasa dependiente de K618 y el motivo lineal YKTL, como reguladores positivos de la actividad endocítica de *PvSYMRK*.

La etapa inicial de este trabajo se centró en describir la distribución subcelular de *PvSYMRK-EGFP* en las células epidermales de la raíz de *P. vulgaris*, encontrando que el receptor quimérico se asocia a la membrana plasmática de las células epidermales tipo “*nonhair*” y del ápice del pelo radical, así como a estructuras tipo *puncta* intracelulares observadas en ambos tipos celulares (Fig. 4). La inoculación con rhizobia induce una redistribución de *PvSYMRK-EGFP* en pelos radicales que presentan filamentos de actina fragmentados en la zona apical (Fig. 15). La fragmentación de estos filamentos es una característica de la respuesta del pelo radical a la incubación con rhizobia (Cárdenas *et al.*, 1998; Maekawa-Yoshikawa y

Murooka, 2009; Yokota *et al.*, 2009). En estas células, *PvSYMRK-EGFP* desaparece de la membrana plasmática y los *puncta* intracelulares son más abundantes en los pelos radicales, un patrón similar al observado en pelos radicales de *M. truncatula* que expresan *MtDMI2-GFP* y tratados con factores Nod (Riely *et al.*, 2013). Estos datos marcaron la pauta para explorar la hipótesis sobre la posible endocitosis de SYMRK.

En células vegetales, la relación funcional entre la distribución dual de RLKs asociados a la membrana plasmática y la endocitosis se demostró al estudiar la actividad de las proteínas BRI1, FLS2, BOR1 y PIN. Estudios adicionales condujeron a la identificación de correceptores, proteínas inhibidoras y otros reguladores asociados con la endocitosis de receptores en plantas (Robatzek *et al.*, 2006; Dhonukshe *et al.*, 2007; Geldner *et al.*, 2007; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012; Irani *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2020).

Para sustentar la hipótesis sobre la actividad endocítica de *PvSYMRK-EGFP*, consideramos imperativo documentar la función de residuos conservados en SYMRK y el efecto de inhibidores específicos de endocitosis y de tráfico vesicular y la función de residuos en la distribución subcelular de *PvSYMRK-EGFP* (Figs. 6-11). Se encontró que el tratamiento con IKA o TyrA23, disruptores de CME (Onelli *et al.*, 2008; Elkin *et al.*, 2016), y la eliminación del tetrapéptido YXXØ (*PvSYMRK*(Δ YKTL)-EGFP; Figs. 8, 9, 14, 15) tienen un efecto perjudicial sobre el número de *puncta* que contienen *PvSYMRK-EGFP*, lo que indica que *PvSYMRK-EGFP* es endocitado vía CME. El motivo YXXØ, blanco del inhibidor TyrA23, es el sitio de unión para la subunidad μ 2 del complejo adaptador AP2 de la maquinaria CME (Kadlecova *et al.*, 2017). La función del motivo YXXØ en CME se describió originalmente en células de mamíferos (Banbury *et al.*, 2003). Pronto se hizo evidente que tiene una función similar en la CME de las plantas. Mutaciones puntuales en el motivo YXXØ afectan la CME de LeEix2 (Bar y Avni 2009) y OsNAS2 (enzima transmembranal nicotianamina sintasa de arroz; Nozoye *et al.*, 2014). Recientemente se reportó que la endocitosis de BRI1 es inducida, en parte, por la unión del motivo BRI1 YKAI a la subunidad μ del complejo adaptador AP2 (Liu *et*

al., 2020). En una situación análoga, la actividad de la cinasa y la respuesta de autoincompatibilidad funcional en el receptor SRKb fueron abolidas por la sustitución Y600A en el motivo YEYL (Yamamoto *et al.*, 2018). El motivo YXXØ también se ha conectado con la endocitosis y la localización polar de BOR1 (Takano *et al.*, 2010) y los transportadores de auxina PIN (Glanc *et al.*, 2018). En raíces con baja disponibilidad de boro (B), el exportador vegetal de B, BOR1 tiene una localización polar distintiva en la membrana plasmática, mientras que, en alta disponibilidad de B, el exportador se endocita y degrada rápidamente (Takano *et al.*, 2010). La sustitución triple, Y-por-A, en los motivos YXXØ conduce a la localización apolar de la proteína BOR1 mutada en condiciones de bajo B, y no hay endocitosis ni degradación de BOR1 cuando se aumenta concentración de B (Takano *et al.*, 2010). Si bien los mecanismos subyacentes aún no han sido descifrados por completo, se sabe que la localización polar específica de las proteínas PIN depende de CME, reciclaje endosómico y transporte vesicular polarizado, lo que determina una dinámica translocación de PIN entre los diferentes lados de la célula (Glanc *et al.*, 2018; Zwiewka *et al.*, 2019). El bucle hidrofílico (citoplásmico) de todos los PIN largos contiene de tres a cuatro motivos YXXØ (Huang *et al.*, 2010). Las sustituciones Y por A en los motivos YXXØ en PIN1 altera la unión del transportador a las adaptinas μ en ensayos *in vitro* (Sancho-Andrés *et al.*, 2016).

Adicionalmente, en este trabajo se demostró que, en las células epidermales de raíces tratadas con brefeldina A (BFA), en *PvSYMRK-EGFP* se acumula en estructuras subcelulares que se asemejan a compartimentos inducidos por BFA (Figs. 6, 7). Por lo tanto, la homeostasis de *PvSYMRK-EGFP* en la membrana plasmática de las células epidermales pudiera implicar un paso de reciclaje endosómico, como es el caso de BRI1, FLS2, BOR1, PIN1/PIN2 y FERONIA (Robatzek *et al.*, 2006; Geldner *et al.*, 2007; Dhonukshe *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2009; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012; Irani *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2020). Además, se encontró que la mutación no fosforilable T589A compromete la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* (*PvSYMRK(T589A)-EGFP* Fig. 15). Se sabe que T593, equivalente a *PvSYMRK* T589, es fundamental para la activación -

dependiente de la fosforilación - de *Lj*SYMRK (Yoshida y Parniske 2005). Por lo tanto, es plausible que la eficiencia de la endocitosis *Pv*SYMRK-EGFP dependa del "fosfo-código" de T589. El estado de fosforilación de residuos Thr y Ser ubicados en la región yuxtamembranal intracelular (YXMi), es relevante para la endocitosis del importador de boro *At*NIP5; 1 (Thr en las repeticiones TPG; Takano *et al.*, 2010; Bertoni 2017) y el transportador de metales *At*NRAMP (Ser20; Castaings *et al.*, 2021). En qué medida el "fosfo-código" de T842 y T872 en BRI1 (Wang *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2012), T867 en FLS2 (Robatzek *et al.*, 2006) y T680, T705 en XA21 (Chen *et al.*, 2010) están relacionados con su actividad endocítica es una cuestión que queda por explorar.

Otro aspecto interesante, la mutación K618E (cinasa muerta/inactiva) previene la endocitosis de *Pv*SYMRK-EGFP (*Pv*SYMRK(K618E)-EGFP, Fig. 14), lo que denota una relación funcional entre un receptor completamente activo y la endocitosis. Aunque tal relación no se ha abordado directamente en otras RLK de plantas que presentan endocitosis, el efecto inhibitor de los mutantes tipo cinasa muerta/inactiva en la vía de señalización de algunos RLKs abre la puerta a algunas propuestas. Por ejemplo, al analizar la mutante cinasa muerta/inactiva BRI1 (K911E) KD, fue evidente que la actividad cinasa de BRI1 es crucial para la ubiquitinación de BRI1, un paso crítico en la endocitosis de BRI1 (Liu *et al.*, 2020). Además, la interacción funcional entre BRI1 y su correceptor, BAK1, es defectuosa en plantas que expresan BRI1 KD o BAK1 KD (Wang *et al.*, 2005). Por el contrario, la actividad cinasa de BAK1 no es necesaria para la inducción dependiente de flg22, de la formación del complejo FLS2-BAK1 KD, pero bloquea la activación de la señalización río abajo (Schulze *et al.*, 2010).

Actualmente, la endocitosis inducida por una RLK asociada a la membrana plasmática se describe como un proceso celular involucrado en un paso específico de la comunicación molecular entre el exterior y el interior de la célula. En este caso, la endocitosis generalmente se induce mediante la unión de un ligando o inductor externo específico de RLK, que desencadena la activación o la inhibición de la respectiva vía de señalización posterior dependiente de RLK (Claus *et al.*, 2018).

Por lo tanto, es razonable postular que la endocitosis de SYMRK inducida por rhizobia modula la duración y amplitud de la vía de señalización dependiente de SYMRK, esencial para la infección epidermal. En ese sentido, la identificación de las señales moleculares que desencadenan la endocitosis de SYMRK es crucial. Los datos obtenidos en este trabajo proporcionan algunas pistas en esa dirección. La endocitosis de PvSYMRK-EGFP inducida por rhizobia parece depender de los factores Nod, ya que no se induce en los pelos radicales en respuesta a la cepa *R. etli* CFNX89, deficiente en factores Nod (Fig. 15). Cabe mencionar que la observación del reordenamiento del citoesqueleto de actina en respuesta a *R. etli* CFNX89 fueron inesperados, ya que contrastan con el conocimiento actual que marca que tal rearrreglo en los filamentos de actina se presenta en respuesta a la exposición de factores Nod exógenos (Sieberer y Emmons 2000; Timmers 2008; Yokota *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2021). No obstante, sería interesante explorar la posibilidad de que una señal molecular bioactiva, diferente a los factores Nod, pudiera estar involucrada en el mecanismo de reordenamiento del citoesqueleto. Una opción aún no explorada, es el potencial que pudieran tener los exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) sintetizados por rhizobia (Jones *et al.*, 2008; Maillet *et al.*, 2020; Acosta-Jurado *et al.*, 2021) como elicitores de la despolimerización de actina. Tal actividad ha sido asociada a la inmunidad en plantas (Zipfel y Oldroyd 2017; Sassmann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

Otro aspecto para tener en cuenta es la presencia de un dominio tipo MLD (malectin-like domain) y regiones LRR en el ectodominio SYMRK, lo que ha sugerido que un oligosacárido, o un oligopéptido, pudieran tener una actividad de ligando de este receptor (Kosuta *et al.*, 2011; Antolín-Llovera *et al.*, 2014a; Li *et al.*, 2018).

En este sentido, según Antolín-Llovera *et al.*, (2014b) en raíces de *L. japonicus* inoculadas con rhizobia, *LjSYMRK* forma un heterodímero con el correceptor de factores Nod *LjNFR5*. Tal interacción parece estar mediada por los LRR de *LjSYMRK*, mientras que, en raíces no inoculadas, MLD impide la interacción *LjSYMRK/LjNFR5* y promueve la degradación de *LjSYMRK*. Si la endocitosis inducida por PvSYMRK-EGFP depende del ectodominio PvSYMRK o depende de

la interacción *PvSYMRK/PvNFR5* son preguntas importantes que deberán ser abordadas en estudios futuros. El disponer de ligandos específicos de los receptores BRI1, FLS2, CERK, BOR1 y LeEix2, respectivamente, fue un elemento crucial en la identificación de correceptores e inhibidores y descifrar la dinámica de inducción de la endocitosis de estos, y otros receptores (Sharfman *et al.*, 2011; Bücherl *et al.*, 2017; Erwig *et al.*, 2017; Hutten *et al.*, 2017; Bozsoki *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Yoshinari *et al.*, 2021). Por lo que, la identificación del ligando de *PvSYMRK* es sin duda fundamental para futuros estudios sobre los mecanismos moleculares y las rutas de tráfico involucradas en la regulación de la endocitosis de *PvSYMRK-EGFP* inducida por rhizobia y, por lo tanto, en la disección de los detalles de la señalización simbiótica desencadenada por SYMRK.

Por otro lado, la caracterización de interacciones proteína-proteína moduladas por la unión de ligandos o por la asociación de proteínas tipo MLD, LRR, LysM, entre otras, es tema actualmente en estudio, tal es el caso de Malectin-Like/LRR-RLK IOS1, CAMEL (*Canalization-related Auxin-regulated Malectin-type RLK*)–CANAR (*Canalization-related Receptor-like kinase*), y un creciente número de receptores de plantas actualmente en estudio (Schallus *et al.*, 2008; Yeh *et al.*, 2016; Franck *et al.*, 2018; Xi *et al.*, 2019; Hajný *et al.*, 2020).

Respecto a la posible interacción de SYMRK con un correceptor, en un estudio reciente se documentó la relación funcional entre SYMRK y BAK1, implicada en la supresión rhizobiana de la respuesta inmune de las plantas (Feng *et al.*, 2021). BAK1/SERK3 es un correceptor versátil que forma heterodímeros con diversos RLKs, como BRI1, FLS2, EFR, BIR1, PEPR1/PEPR2, entre otros (Chinchilla *et al.*, 2009). Por lo tanto, BAK1 juega un papel central en los procesos asociados con la regulación, el desarrollo, la muerte celular programada y las respuestas inmunes de las hormonas vegetales (Gao *et al.*, 2019; Mao y Li 2020). Por otro lado, el conocimiento actual indica que la señalización de la rhizobia se produce a través de factores Nod y elicitores tipo MAMP (patrón molecular asociado a microbios), que activan transitoriamente una respuesta de inmunidad desencadenada por MAMP o MTI (siglas de *MAMP-triggered immunity*). Así mismo existen datos que sugieren

que los factores Nod están implicados en la supresión de la respuesta inmune de las plantas (Antolín-Llovera *et al.*, 2014a; Cao *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2022).

En perspectiva, los desafíos futuros en el estudio de SYMRK se centrarán en la identificación del ligando de PvSYMRK, un paso fundamental hacia descifrar la relación funcional y celular entre la activación de SYMRK, la endocitosis inducida por rhizobia, la consecuente activación molecular de la cascada de señalización y la interacción SYMRK-BAK1, asociada con la respuesta inmune y los procesos de infección en las etapas iniciales de nodulación. Otro aspecto relevante, consiste en extrapolar el conocimiento adquirido a receptores SYMRK de otras leguminosas, en la relación simbiótica planta-micorrizas y planta-patógeno.

8.- CONCLUSIONES

PvSYMRK-EGFP tiene una actividad endocítica dual: constitutiva, en células epidermales de la raíz de *P. vulgaris* no inoculada, e inducida en los pelos que responden a rhizobia y requiere de factores Nod. Ambas actividades endocíticas son dependientes del "fosfo-código" o fosforilación del residuo treonina en la posición 589 en *PvSYMRK* (LJT593); la actividad cinasa de *PvSYMRK* es otro elemento esencial en la endocitosis constitutiva e inducida de este receptor, tal como lo indican la disminución en la internalización de la cinasa muerta/inactiva *PvSYMRK*(K618E)-EGFP.

La eliminación del motivo tipo YXXØ presente en *PvSYMRK* (*PvSYMRK*(ΔYKTL)-EGFP) conduce a una significativa reducción de la actividad endocítica dual de *PvSYMRK*, lo que sustenta que el tetrapéptido YKTL es un motivo endocítico que etiqueta a SYMRK como blanco de interacción con la subunidad μ del complejo adaptador AP2 y formación de la vesícula endocítica recubierta de clatrina. El efecto de los inhibidores IKA y TyrA23 sobre la internalización de *PvSYMRK-EGFP* refuerza la propuesta de una endocitosis mediada por clatrina.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la hipótesis planteada y abre nuevos paradigmas. El demostrar la endocitosis de SYMRK es una contribución significativa a la comprensión de los mecanismos celulares que regulan la función de este receptor. También plantea futuros desafíos orientados a descifrar los mecanismos moleculares y celulares asociados a la endocitosis de SYMRK inducida por rhizobia y la identificación de ligandos, coreceptores, reguladores, entre otros.

9.- PERSPECTIVAS

Los resultados de este proyecto plantean una serie de paradigmas que pudieran ser abordados utilizando algunas de las siguientes estrategias:

1. Con el objetivo de identificar la localización de los *puncta* encontrados se puede realizar un análisis comparativo de la distribución de PvSYMRK-EGFP en compartimentos tipo *post*-TGN/EE y endosomas de reciclaje en células epidermales de raíz de *P. vulgaris* pre- y *post*-inoculados con rhizobia y tratados con con inhibidores de trafico vesicular y endocíticos BFA, IKA, TyrA23 y CHX.
2. Realizar un análisis comparativo del transcrito de PvSYMRK y de genes cuya expresión se induce al inicio de la nodulación (por ejemplo, NIN, ENOD40 y ERN1) en pelos radicales de frijol incubados con cepas de rhizobia productoras o defientes en la síntesis y secreción de factores Nod. Este análisis nos permitirá investigar la temporalidad y dinámica de las respuestas involucradas en este proceso.
3. Explorar si la infección con hongo micorrhizicos y patógenos induce la endocitosis de PvSYMRK-EGFP.
4. Caracterizar la endocitosis de SYMRK en raíces de otras leguminosas inoculadas con rhizobia.
5. Identificar la posible interacción entre PvSYMRK y el correceptor BAK1, como parte del mecanismo que induce la endocitosis de PvSYMRK.
6. Identificar los posibles ligandos extracelulares de PvSYMRK, y analizar si estos inducen la endocitosis de PvSYMRK.

10.- LITERATURA CITADA

1. Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., Luschnig, C. (2006). **Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism.** *Nature Cell Biology*. 8:249-256.
2. Acosta-Jurado, S., Fuentes-Romero, F., Ruiz-Sainz, J.E., Janczarek, M., Vinardell, J.M. (2021). **Rhizobial exopolysaccharides: genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes.** *International Journal of Molecular Sciences*. 22(12):6233.
3. Anieto, F., Robinson, D.G. (2005). **Testing for endocytosis in plants.** *Protoplasma*. 226, 3-11.
4. Antolín-Llovera, M., Petutsching, E.K., Ried, M.K., Lipka, V., Nürnberger, T., Robatzek, S., Parniske, M. (2014a). **Knowing your friends and foes - plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis of defence.** *New Phytologist*. 204, 791-802
5. Antolín-Llovera, M., Ried, M.K., Parniske, M. (2014b). **Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod Factor Receptor 5.** *Current Opinion*. 24(4), 422-7.
6. Baluska, F. (2002). **F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments.** *Plant Physiology*. 130:422-431.
7. Baluska, F., Samaj, J., Hlavacka, A., Kendrick-Jones, J., Volkmann, D. (2004). **Actin dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices.** *Journal Experimental Botany*. 55:463-473.
8. Baluska, F., Volkmann, D., Barlow, P.W. (2000). **Actin-based domains of the 'cell periphery complex' and their associations with polarized 'cell bodies' in higher plants.** *Plant Biology*. 2: 253-267.
9. Banbury, D.N., Oakley, J.D., Sessions, R.B., Banting, G. (2003). **Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex.** *Journal of Biological Chemistry*. 278, 12022-12028.
10. Bandmann, V., Müller, J.D., Köhler, T., Homann, U. (2012). **Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 586(20):3626-32.
11. Baños-Vázquez, Luis Alfredo. (2013). **Reorganización de los microfilamentos de actina en los pelos radicales de frijol durante la formación del hilo de infección.** Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM.
12. Bañuelos-Vázquez, Luis Alfredo. (2012). **Reorganización de los microfilamentos de actina en los pelos radicales de frijol durante la formación del hilo de infección.** Tesis Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

13. Bañuelos-Vázquez, Luis Alredo. (2009). **Visualización de los sitios de exocitosis durante el crecimiento polar en pelos radicales vivos de leguminosas y durante la infección con Rhizobium.** Tesis de licenciatura. Universidad Juárez del Estado de Durango
14. Bar, M., Avni, A. (2009). **EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2.** *The Plant Journal*. 59, 600-611.
15. Battey, NH., James, NC., Greenland, AJ., Brownlee, C. (1999). **Exocytosis and endocytosis.** *Plant Cell*. 11: 643-660.
16. Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D., Robatzek, S. (2012). **Spatio-temporal cellular dynamics of the Arabidopsis flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting.** *Plant Cell*. 24(10):4205-19.
17. Bersoult, A., Camut, S., Perhald A., Kereszt, A., Kiss, G., Cullimore, J. (2005). **Expression of the *Medicago truncatula* DMI2 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:869-876.
18. Bertoni, G. (2017). **Threonine phosphorylation regulates polar localization of the boric acid transporter NIP5;1 in root cells.** *The Plant Cell*. 29(4), 605.
19. Betz., WJ., Mao, F., Smith, CB. (1996). **Imaging exocytosis and endocytosis.** *Current Opinion Neurobiology*. 6:365-371.
20. Bhattacharya, A., Paul, A., Chakrabarti, D., DasGupta, M. (2019). **Gatekeeper-activation loop cross-talk determines distinct autoactivation states of symbiosis receptor kinase.** *Biochemistry*. 58, 2418-2431.
21. Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, ND., Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). **FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells.** *Journal Microscopy*. 214:159-173.
22. Bonifacino, JS., Dell'Angelica, EC. (1999). **Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals.** *The Journal of Cell Biology*. 145(5), 923-926.
23. Bozsoki, Z., Gysel, K., Hansen, SB., *et al.* (2020). **Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity.** *Science*. 369, 663-670.
24. Brom, S., de los Santos, A.G., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., Palacios, R. (1992). **Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance.** *Journal of Bacteriology*. 174(16):5183–5189.
25. Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). **Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans.** *The Biochemical Journal*, 125(4), 1075–1080.
26. Bücherl, CA., Jarsch, IK., Schudoma, C., Segonzac, C., Mbengue, M., Robatzek, S., MacLean, D., Ott, T., Zipfel, C. (2017). **Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains.** *eLife* 6, e25114.

27. Camacho, L., y Malho, R. (2003). **Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca²⁺ and GTPases.** *Journal of Experimental Botany.* 54, 83–92.
28. Campo, S., Manrique, S., García-Martínez, J., San-Segundo, B. (2008). **Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression.** *Plant Biotechnology Journal.* 6:585-608.
29. Cao, Y., Halane, M.K., Gassmann, W., Stacey, G. (2017). **The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis.** *Annual Review of Plant Biology.* 68:535–561.
30. Capistran López, A. (2016). **Análisis fenotípico de raíces transgénicas de Phaseolus vulgaris que expresan PvCLC2-RNAi y PvCLC3-RNAi.** Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
31. Capoen, W., Goormachtig, S., De Rycke, R., Schoroyers, K., Holsters, M. (2005). **SrSYMRK, a plant receptor essential for symbiosome formation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102:10369-10374.
32. Cárdenas, L. (2009). **New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells.** *Plant Signaling & Behavior.* 4:4-8
33. Cárdenas, L., Alemán, E., Navá, N., Santana, O., Sánchez, F., Quinto, C. (2006). **Early responses to nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating Phaseolus vulgaris mutant.** *Planta.* 223:746-754
34. Cárdenas, L., Feijó, J., Kunke, J., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P., Quinto, C. (1999). **Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs.** *Plant Journal.* 19:347-352
35. Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, TL., Sánchez, F., Quinto, C. Feijó, JA., Kunkel, JG., Hepler, PK. (2000). **Ion changes in legume root hairs responding to nod factors.** *Plant Physiology.* 123:443-452
36. Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., Quinto, C. (2008). **Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors.** *The Plant Journal.* 56, 802-813.
37. Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, PK., Quinto, C. (1998). **Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to Rhizobium etli nodulation signals.** *Plant Physiology.* 116:871-877.
38. Carluccio, AV., y Stavolonem, L. (2014). **Interference of Brefeldin A in viral movement protein tubules assembly.** *Plant Signaling & Behavior.* 15:9.
39. Castaings, L., Alcon, C., Kosuth, T., Correia, D., Curie, C. (2021). **Manganese triggers phosphorylation-mediated endocytosis of the Arabidopsis metal transporter NRAMP1.** *The Plant Journal.*
40. Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, RV., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., Denario, J. (2000). **Four genes of Medicago truncatula controlling components of a nod factor transduction pathway.** *Plant Cell.* 12:1647-1666.
41. Chebli, Y., Kroeger, J., Geitmann, A. (2013). **Transport logistics in pollen tubes.** *Molecular Plant.* 6(4):1037-52.

42. Chen, T., Teng, N., Wu, X., Wang, Y., Tang, W., Samaj, J., Baluska, F., Lin, J. (2007). **Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking.** *Plant Cell Physiology*. 48(1):19-30.
43. Chen, T., Zhu, H., Ke, D., Cai, K., Wang, C., Gou, H., Hong, Z., Zhang, Z. (2012). **A MAP Kinase Kinase Interacts with SYMRK and Regulates Nodule Organogenesis in *Lotus japonicus*.** *The plant Cell*. 24:823-838.
44. Chen, X., Chern, M., Canlas, PE., Jiang, C., Ruan, D., Cao, P., Ronald, PC. (2010). **A conserved threonine residue in the juxtamembrane domain of the XA21 pattern recognition receptor is critical for kinase autophosphorylation and XA21-mediated immunity.** *The Journal of Biological Chemistry*. 285(14), 10454-10463.
45. Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., Kemmerling, B. (2009). **One for all: the receptor-associated kinase BAK1.** *Trends in Plant Science*. 14(10):535–541.
46. Choi, SW., Tamaki, T., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A. (2013). **RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING2 receptor.** *Plant Cell*. 25(3):1174-87.
47. Claus, LAN., Sabatin, DV., Russinova, E. (2018). **The crossroads of receptor-mediated signaling and endocytosis in plants.** *Journal of Integrative Plant Biology*. 60(9), 827-840.
48. Conner, SD., y Schmid, SL. (2003). **Regulated portals of entry into the cell.** *Nature*. 422:37-44.
49. Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martínez-Romero, E., Romero, D. (1999). **The nolL gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor.** *Molecular Plant Microbe Interaction*. 12(3):236–246.
50. Čovanová, M., Sauer, M., Rychtář, J., Friml, J., Petrášek, J., Zažímalová, E. (2013). **Overexpression of the auxin binding protein1 modulates PIN-dependent auxin transport in tobacco cells.** *Public Library of Science One*. 23:8(7).
51. Craddock, C., y Yang, Z. (2012). **Endocytic signaling in leaves and roots: same rules different players.** *Frontiers in Plant Science*. 3:219.
52. Cullimore, JV., Ranjeva, R., Bono, JJ. (2001). **Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes.** *Trends in Plant Sciences*. 6:24-30.
53. DaSilva, LLP., Foresti, O., Denecke, J. (2006). **Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail.** *The Plant Cell*. 18, 1477-1497.
54. Dávila-Delgado Raúl. (2012). **Análisis de la expresión del receptor tipo cinasa con cominos repetidos ricos en leucina (*PvSymRK*) en pelos radicales de riñol tratados con actores de nodulación.** Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
55. Dávila-Delgado, R., Bañuelos-Vázquez, LA., Monroy-Morales, E., Sánchez-López, R. (2020). ***Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604: a useful**

- biological tool to study initial infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation.** *Planta*. 252: 69.
56. Dávila-Delgado, R., Flores-Canúl, K., Juárez-Verdayes, M.A., & Sánchez-López, R. (2023). **Rhizobia induce SYMRK endocytosis in *Phaseolus vulgaris* root hair cells.** *Planta*, 257(4), 83.
 57. Dávila-Delgado, R., Gómez-Méndez, MF., Vera-Estrella, R., Sánchez-López, R. (2019). **Endocitosis en plantas (parte 1): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas.** *Revista de Educación Bioquímica (REB)*. 38(1):14-22.
 58. Den Herder, G., Yoshida, S., Antolin-Llovera, M., Ried, MK., Parniske, M. (2012). ***Lotus japonicus* E3 Ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection.** *Plant Cell*. 24:1691-1707.
 59. Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, DG., Mravec, J., Stierhof, YD., Friml, J. (2007). **Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*.** *Current Biology*. 17: 520-527.
 60. Di Rubbo, S., Irani, NG., Kim, SY., Xu, ZY., Gadeyne, A., Dejonghe, W., Vanhoutte, I., Persiau, G., Eeckhout, D., Simon, S., Song, K., Kleine-Vehn, J., Friml, J., De Jaeger, G., Van Damme, D., Hwang, I., Russinova, E. (2013). **The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 25(8):2986-97.
 61. Di Sansebastiano, GP., Paris, N., Marc-Martin, S., Neuhaus, JM. (1998). **Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway.** *Plant Journal*. 15:449-457.
 62. Doherty, GJ. y McMahon, HT. (2009). **Mechanisms of endocytosis.** *Annual Review Biochemical*. 78:857-902.
 63. Elkin, SR., Oswald, NW., Reed, DK., Mettlen, M., MacMillan, JB., Schmid, SL. (2016). **Ikarugamycin: a natural product inhibitor of clathrin-mediated endocytosis.** *Traffic*. 17, 1139-1149.
 64. Endre, G., Kereszt, A., Kevel, Z., Mihaea, S., Kaló, P., B, György. (2002). **A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development.** *Nature*. 417:962-966.
 65. Engqvist-Goldstein, AE., Drubin, DG. (2003). **Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals.** *Annual Review Cell Development Biology*. 19:287-332.
 66. Erwig, J., Ghareeb, H., Kipischke, M., Hacke, R., Matei, A., Petuschnig, E., Lipka. (2017). **Chitin-induced and CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of *Arabidopsis thaliana* LYS MOTIF-CONTAINING RECEPTOR LIKE KINASE5 (LYK5).** *New Phytologist*. 215, 382-396.
 67. Esseling, JJ., Lhuissier, FGP., Emons, AMC. (2004). **A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in NORK-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria.** *The Plant Cell*. 16, 933-944.
 68. Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, JE., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, PM., Sanchez, F.

- (2007). **Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*.** *Nature Protocols*. 2:1819-1824.
69. Fähræus, G. (1957). **The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique.** *The Journal of General Microbiology*. 16(2):374–381.
 70. Fan, L., Hao, H., Xue, Y., Zhang, L., Song, K., Ding, Z., Botella, MA., Wang, H., Lin, J. (2013). **Dynamic analysis of *Arabidopsis* AP2 σ subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development.** *Development*. 140(18):3826-37.
 71. Feng, Y., Wu, P., Liu, C., Peng, L., Wang, T., Wang, C., Tan, Q., Li, B., Ou, Y., Zhu, H., Yuan, S., Huang, R., Stacey, G., Zhang, Z., Cao, Y. (2021). **Suppression of LjBAK1-mediated immunity by SymRK promotes rhizobial infection in *Lotus japonicus*.** *Molecular Plant* 14(11):1935–1950.
 72. Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). **Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation.** *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76.
 73. Flores Canúl, Karen. (2013). **Determinación de la actividad espacio-temporal del promotor de PvSYMRK durante la nodulación en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris*.** Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
 74. Franck, CM., Westermann, J., Boisson-Dernier, A. (2018). **Plant malectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond.** *Annual Review of Plant Biology*. 69, 301-328.
 75. Fritz-Laylin, LK., Krishnamurthy, N., Tör, M., Sjölander, V., Jones, JDG. (2005). **Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*. 138, 611-623.
 76. Gao, X., Ruan, X., Sun, Y., Wang, X., Feng, B. (2019). **BAKING up to survive a battle: functional dynamics of BAK1 in plant programmed cell death.** *Frontiers in Plant Science*. 9:1913.
 77. Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jurgens, G. (2003). **The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin dependent plant growth.** *Cell*. 112:219-230.
 78. Geldner, N., Friml, J., Stierhof, YD., Jurgens, G., Palme, K. (2001). **Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking.** *Nature*. 413:425-428.
 79. Geldner, N., Hyman, DL., Wang, X., Schumacher, K., Chory, J. (2007). **Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1.** *Genes Development*. 21(13):1598-602.
 80. Genre, A., Russo, G. (2016). **Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant–Microbe Interactions?** *Frontiers in Plant Science*. 7: 96.
 81. Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S. (2008) **SYMRK defines a common genetic basis for plant root endosymbiosis with arbuscular**

- mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105:4928-4932.
82. Glanc, M., Fendrych, M., Friml, J. (2018). **Mechanistic framework for cell-intrinsic re-establishment of PIN2 polarity after cell division.** *Nature Plants.* 4, 1082-1088.
 83. Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, MA., van Weeren, L., Gadella, TW Jr., Royant, A. (2012). **Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%.** *Nature Communication.* 20-3:751.
 84. Golani, Y., Kaye, Y., Gilhar, O., Ercetin, M., Gillasp, G., Levine, A. (2013). **Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis.** *Molecular Plant.* 6(6):1781-94.
 85. Gómez-Méndez, MF., Dávila-Delgado, R., Sánchez-López, R., Vera-Estrella, R. (2019). **La endocitosis en plantas (parte 2): cómo estudiarla utilizando inhibidores.** *Revista de Educación Bioquímica (REB).* 38(2):38-47.
 86. Grebe, M., Xu, J., Möbius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, HJ., Rook, MB., Scheres, B. (2003). **Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes.** *Current Biology.* 13(16):1378-87.
 87. Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., & Schiefelbein, J. (2014). **Root Hairs.** *The Arabidopsis Book,* 12(12), e0172
 88. Gruszka, D. (2013). **Brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance.** *International Journal of Molecular Science.* 14, 8740-8774.
 89. Guan, Y., Guo, J., Li, H., Yang, Z. (2013). **Signaling in pollen tube growth: crosstalk, feedback, and missing links.** *Molecular Plant.* 6(4):1053-64.
 90. Guo, F., y McCubbin, AG. (2012). **The pollen-specific R-SNARE/longin PiVAMP726 mediates fusion of endo- and exocytic compartments in pollen tube tip growth.** *Journal of Experimental Botany.* 63(8):3083-95.
 91. Hajný, J., Prát, T., Rydza, N., Rodriguez, L., Tan, S., Verstraeten, I., Domjan, D., Mazur, E., Smakowska-Luzan, E., Smet, W., Mor, E., Nolf, J., Yang, B., Grunewald, W., Molnár, G., Belkhadir, Y., De Rybel, B., Friml, J. (2020). **Receptor kinase module targets PIN-dependent auxin transport during canalization.** *Science.* 30;370(6516):550-557.
 92. Haney, C H., Riely, BK., Tricoli, DM., Cook, DR., Ehrhardt, DW., Long, SR. (2011). **Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3.** *Plant Cell.* 23:2774-2787.
 93. Haupt, S., Cowan, GH., Ziegler, A., Roberts, AG., Oparka, KJ., Torrance, L. (2005). **Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway.** *Plant Cell.* 17:164-181.
 94. Henty-Ridilla, JL., Shimono, M., Li, J., Chang, JH., Day, B., Staiger, CJ. (2013). **The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns.** *Public Library of Science Pathogen.* 9(4).

95. Hok, S., Danchin, EG., Allasia, V., Panabières, F., Attard, A., Keller, H. (2011). **An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease.** *Plant, Cell and Environment*. 34:1944-1957.
96. Holstein, SE. (2002). **Clathrin and plant endocytosis.** *Traffic*. 3:614-620.
97. Holstein, SE. (2005). **Molecular dissection of the Clathrin-Edocytosis machinery in Plants.** *Plant Endocytosis*. 83-95.
98. Huang, F., Zago, MK., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, CS., Offringa, R. (2010). **Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport.** *The Plant Cell*. 22, 1129-1142.
99. Huisman, R., Geurts, R. (2020). **A Roadmap toward Engineered Nitrogen-Fixing Nodule Symbiosis.** *Plant Communications*. 1(1) 100019.
100. Hussey, PJ., Allwood, EG., Smertenko, AP. (2002). **Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 357:791-798.
101. Hutten, SJ., Hamers, DS., Aan den Toorn, M., van Esse, W., Nolles, A., Buécherl, CA., de Vries, SC., Hohlbein, J., Borst, JW. (2017). **Visualization of BRI1 and SERK3/BAK1 nanoclusters in Arabidopsis roots.** *Public Library of Science ONE*. 12, e0169905
102. Ichikawa, M., Hirano, T., Enami, K., Fuselier, T., Kato, N., Kwon, C., Voigt, B., Schulze-Lefert, P., Baluška, F., Sato, MH. (2014). **Syntaxin of plant proteins SYP123 and SYP132 mediate root hair tip growth in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Physiol*. 55(4):790-800.
103. Idilli, Al., Morandini, P., Onelli, E., Rodighiero, S., Caccianiga, M., Moscatelli, A. (2013). **Microtubule depolymerization affects endocytosis and exocytosis in the tip and influences endosome movement in tobacco pollen tubes.** *Molecular Plant*. 6(4):1109-30.
104. Ingram, GC. (2007). **Cell signaling: the merry lives of BAK1.** *Current Biology*. 17: R603-R605.
105. Irani, NG., Di Rubbo, S., Mylle, E., Van den Begin, J., Schneider-Pizoń, J., Hnilíková, J., Šiša, M., Buyst, D., Vilarrasa-Blasi, J., Szatmári, AM., Van Damme, D., Mishev, K., Codreanu, MC., Kohout, L., Strnad, M., Caño-Delgado, Al., Friml, J., Madder, A., Russinova, E. (2012). **Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane.** *Nature Chemical Biology*. 8(6):583-9.
106. Ischebeck, T., Werner, S., Krishnamoorthy, P., Lerche, J., Meijón, M., Stenzel, I., Löffke, C., Wiessner, T., Im, YJ., Perera, IY., Iven, T., Feussner, I., Busch, W., Boss, WF., Teichmann, T., Hause, B., Persson, S., Heilmann, I. (2013). **Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis.** *Plant Cell*. 25(12):4894-911.
107. Ivanov, R., Vert, G. (2021). **Endocytosis in plants: peculiarities and roles in the regulated trafficking of plant metal transporters.** *Biology of the Cell*. 113, 1-13.

108. Jackson, CL., y Casanova, JE. (2000). **Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors.** *Trends Cell Biology.* 10: 60-67.
109. Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Gaude, T. (2007). **The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants.** *Cell.* 130:1057-1070.
110. Jarsch, IK., Ott, T. (2011). **Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions.** *Molecular Plant Microbe Interactions.* 24(1):7-12.
111. Jelínková, A., Malínská, K., Simon, S., Kleine-Vehn, J., Parezová, M., Pejchar, P., Kubes, M., Martinec, J., Friml, J., Zazímalová, E., Petrásek, J. (2010). **Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking?** *Plant Journal.* 61(5):883-92.
112. Jones, K.M., Sharopova, N., Lohar, D.P., Zhang, J.Q., VandenBosch, K.A., Walker, G.C. (2008). **Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 105(2):704–709
113. Jurgens, G. (2004). **Membrane trafficking in plants.** *Annual Review Cell Development Biology.* 20:481-504.
114. Kadlecova, Z., Spielman, S.J., Loerke, D., Mohanakrishnan, A., Reed, D.K., Schmid, S.L. (2017). **Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2.** *Journal of Cell Biology* 216(1):167–179.
115. Kang, HC., Burgund, ED., Lugar, HM., Petersen, SE., Schlaggar, BL. (2003). **Comparison of functional activation foci in children and adults using a common stereotactic space.** *NeuroImage.* 19:16–28
116. Karimi, M., Inze, D., Depicker, A. (2002). **Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation.** *Trends in Plant Science.* 7:193-195.
117. Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Yoyoda, A., Fujiwara, T. (2011). **High Boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*.** *The Journal of Biological Chemistry.* 286(8) 6175-6183.
118. Kawchuk, LM., Hachey, J., Lynch, DR, *et al.* (2001). **Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98(11), 6511-6515.
119. Ketelaar, T., de Ruijter, NC., Emons, AM. (2003). **Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs.** *Plant Cell.* 15: 285–292.
120. Ketelaar, T., Galway, ME., Mulder, BM., Emons, AM. (2008). **Rates of exocytosis and endocytosis in *Arabidopsis* root hairs and pollen tubes.** *Journal of Microscopy.* 231(2):265-73.
121. Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horvath, GV., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, GB. (2007). **3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*.** *Plant Cell.* 19:3974-3989.

122. Kim, SY., Xu, ZY., Song, K., Kim, DH., Kang, H., Reichardt, I., Sohn, EJ., Friml, J., Juergens, G., Hwang, I. (2013). **Adaptor protein complex 2-mediated endocytosis is crucial for male reproductive organ development in Arabidopsis.** *Plant Cell.* 25(8):2970-85.
123. Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martinière, A, *et al.* (2011). **Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane.** *Molecular Systems Biology.* 7, 540.
124. Konopka, CA., Backues, SK., Bednarek, SY. (2008). **Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane.** *Plant Cell.* 20: 1363–1380.
125. Kosuta, S., Held, M., Hossain, MS., Morieri, G., Macgillivray, A., Johansen, C., Antolín-Llovera, M., Parniske, M., Oldroyd, GE., Downie, AJ. (2011). **Lotus japonicus SYMRK-14 uncouples the cortical and epidermal symbiotic program.** *The Plant Journal.* 67, 929-940.
126. Lam, SK., Cai, Y., Tse, YC., Wang, J., Law, AH., Pimpl, P., Chan, HY., Xia, J., Jiang, L. (2009). **BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells.** *Plant Journal.* 60(5):865-81.
127. Le Roy, C., Wrana, JL. (2005). **Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling.** *Nature Review Molecular Cell Biology.* 6(2):112-26.
128. Lee, YJ., Szumlanski, A., Nielsen, E., Yang, Z. (2008). **Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth.** *Journal of Cell Biology.* 181(7):1155-68.
129. Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Herve, C., Toth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L. (2010). **A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107:2343-2348.
130. Leucci, MR., Di Sansebastiano, GP., Gigante, M., Dalessandro, G., Piro, G. (2007). **Secretion marker proteins and cell-wall polysaccharides move through different secretory pathways.** *Planta.* 225(4):1001-17.
131. Li, H., Chen, M., Duan, L., Zhang, T., Cao, Y., Zhang, Z. (2018). **Domain swap approach reveals the critical roles of different domains of SYMRK in root nodule symbiosis in Lotus japonicus.** *Frontiers in Plant Science.* 9, 1-10.
132. Li, J., Wen, J., Lease, KA., Doke, JT., Tax, FE., Walker, JC. (2002). **BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling.** *Cell.* 110, 213-222.
133. Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., Luu, DT., Maurel, C., Lin, J. (2011). **Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation.** *Plant Cell.* 23(10):3780-97.
134. Liang, P., Schmitz, C., Lace, B., Ditengou, F.A., Su, C., Schulze, E., Knerr, J., Grosse, R., Keller, J., Libourel, C., Delaux, PM., Ott, T. (2021). **Forminmediated bridging of cell wall, plasma membrane, and**

- cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*.** *Current Biology*. 31(12):2712-2719.e5.
135. Libault, M., Brechenmacher, L., Cheng, J., Xu, D., Stacey, G. (2010). **Root hair systems biology.** *Trends Plant Science*. 15(11):641-50.
 136. Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Geurts, R. (2005). **Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:10375-10380.
 137. Liu, D., Kumar, R., Claus, LAN, *et al.*, (2020). **Endocytosis of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is partly driven by a canonical tyrosine-based motif.** *The Plant Cell*. 32, 3598-3612.
 138. Liu, J., Deng, J., Zhu, F., Li, Y., Lu, Z., Qin, P., Wang, T., Dong J. (2018). **The MtDMI2-MtPUB2 negative feedback loop plays a role in nodulation homeostasis.** *Plant Physiology*. 176, 3003–3026.
 139. Liu, P., Rudick, M., Anderson, RG. (2002). **Multiple functions of caveolin-1.** *The Journal of Biological Chemistry*. 277:41295-41298.
 140. Lu, DP., Lin, WW., Gao, XQ., Wu, SJ., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, TP., He, P., Shan, LB. (2011). **Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity.** *Science*. 332:1439-1442.
 141. Luo, Y., Russinova, E. (2017). **Quantitative microscopic analysis of plasma membrane receptor dynamics in living plant cells.** *Methods Molecular Biology* 1564:121–132.
 142. Maekawa-Yoshikawa, M., Murooka, Y. (2009). **Root hair deformation of symbiosis-deficient mutants of *Lotus japonicus* by application of nod factor from *Mesorhizobium loti*.** *Microbes and Environments*. 24(2), 128-134.
 143. Maillet, F., Fournier, J., Mendis, H.C., Tadege, M., Wen, J., Ratet, P., Mysore, K.S., Gough, C., Jones, K.M. (2020). **Sinorhizobium meliloti succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection.** *Plant Journal*. 102(2):311–326.
 144. Mao, J., Li, J. (2020). **Regulation of three key kinases of brassinosteroid signaling pathway.** *International Journal of Molecular Sciences* 21(12):4340.
 145. Markmann, K., Giczey, G., Parniske, M. (2008). **Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria.** *Public Library of Science Biology*. 6:497-506.
 146. Martins, S., Dohmann, EMN., Cayrel, A, *et al.* (2015). **Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination.** *Nature Communications*. 6, 6151.
 147. Matsuoka, K., Bassham, D., Raikhel, N., Nakamura, K. (1995). **Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells.** *Journal Cell Biology*. 130:1307-1318.

148. McMahon, H. y Boucrot, E. (2011). **Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 12(8):517-530.
149. Meckel, T., Hurst, AC., Thiel, G., Homann, U. (2004). **Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged Kp-channel KAT1.** *Plant Journal.* 39:182-193.
150. Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, GED., Downie, JA. (2006). **Analysis of Nod-Factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 19(8), 914-923.
151. Miyata, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., Wang, E. (2022). **Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses.** *Journal of Integrative Plant Biology.* 64(2):244-267.
152. Miyata, K., Hosotani, M., Akamatsu, A., Takeda, N., Jiang, W., Sugiyama, T., Takaoka, R., Matsumoto, K., Abe, S., Shibuya, N., Kaku, H. (2023). **OsSYMRK Plays an Essential Role in AM Symbiosis in Rice (*Oryza sativa*).** *Plant Cell Physiology.* 17;64(4):378-391.
153. Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, JP., Hartmann, MA., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., Bessoule, JJ. (2004). **Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane.** *The Journal of Biological Chemistry.* 279:36277–36286.
154. Monroy-Morales, E. (2013). **Caracterización de la actividad espacio-temporal de promotor sintético prom35S-MSA en raíces transgénicas *Phaseolus vulgaris* inoculados con rhizobia e identificación de genes de *P. vulgaris* cuyos promotores presenten motivos MSA.** Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
155. Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-deBuen, A., & Sánchez-López, R. (2022). **Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation.** *International journal of molecular sciences,* 23(9), 5267.
156. Moscatelli, A., Ciampolini, F., Rodighiero, S., Onelli, E., Cresti, M., Santo, N., Idilli, A. (2007). **Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold.** *Journal of Cell Science.* 120, 3804-3819.
157. Moscatelli, A., Idilli, A., Rodighiero, S., Caccianiga, M. (2012). **Inhibition of actin polymerisation by low concentration Latrunculin B affects endocytosis and alters exocytosis in shank and tip of tobacco pollen tubes.** *Plant Biology.* 14(5), 770–782.
158. Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., Yang, Z. (2012). **ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis.** *Public Library of Science Biology.* 10(4).

159. Nair, A., y Bhargava, S. (2012). **Reduced mycorrhizal colonization (rmc) tomato mutant lacks expression of SYMRK signalling pathway genes.** *Plant Signaling and Behavior*. 7:1578-1583.
160. Nozoye, T., Nagasaka, S., Bashir, K., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N. (2014). **Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXØ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice.** *The Plant Journal*. 77, 246-260.
161. Oh, MH., Clouse, SD., Huber, SC. (2012). **Tyrosine phosphorylation of the BR11 receptor kinase occurs via a post-translational modification and is activated by the juxtamembrane domain.** *Frontiers in Plant Science*. 3, 175.
162. Oldroyd, GE y Downie, JA. (2008). **Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes.** *Annual Review of Plant Biology*. 59:519-546.
163. Oldroyd, GE. (2013). **Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants.** *Nature Review*. 11:252-263
164. Onelli, E., Prescianotto-Baschong, C., Caccianiga, M., Moscatelli, A. (2008). **Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold.** *Journal of Experimental Botany*. 59(11), 3051–3068.
165. Ortiz-Zapater, E., Soriano-Ortega, E., Marcote, MJ., Ortiz-Masia, D., Aniento, F. (2006). **Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A.** *The Plant Journal*. 48, 757-770.
166. Ovecka, M., Lang, I., Baluska, F., Ismail, A., Illes, P., Lichtscheidl, IK. (2005). **Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs.** *Protoplasma*. 226(1-2):39-54.
167. Pagnussat, L., Burbach, C., Baluška, F., de la Canal, L. (2012). **Rapid endocytosis is triggered upon imbibition in Arabidopsis seeds.** *Plant Signal and Behavior*. 7(3):416-21.
168. Parton, RG. y Simons, K. (2007). **The multiple faces of caveolae.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8:185
169. Parton, RM., Fischer-Parton, S., Watahiki, MK., Trewavas, AJ. (2001). **Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes.** *Journal of Cell Science*. 114(14):2685-95.
170. Pei, W., Du, F., Zhang, Y., He, T., Ren, H. (2012). **Control of the actin cytoskeleton in root hair development.** *Plant Science*. 187:10-8.
171. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001). **Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER.** *Nature Cell Biology*. 3:473.
172. Piper, RC., Lehner, PJ. (2011). **Endosomal transport via ubiquitination.** *Trends in Cell Biology*. 21(11):647-655.

173. Piper, RC., y Katzmann, DJ. (2007). **Biogenesis and function of multivesicular bodies.** *Annual Review Cell Development Biology.* 23:519-547.
174. Reuff, M., Mikosch, M., Homann, U. (2010). **Trafficking, lateral mobility and segregation of the plant K channel KAT1.** *Plant Biology.* 12(1):99-104.
175. Ried, MK., Antolín-Llovera, M., Parniske, M. (2014). **Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases.** *eLife* 3:e03891.
176. Riely, BK., Larrainzar, E., Haney, CH., Mun, JH., Gil-Quintana, E., González, EM., Yu, HJ., Tricoli, D., Ehrhardt, DW., Long, SR., Cook DR. (2013). **Development of tools for the biochemical characterization of the symbiotic receptor-like kinase DMI2.** *Molecular Plant Microbe Interaction.* 26(2):216-26.
177. Robatzek, S., Chinchilla, D., Boller, T. (2006). **Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis.** *Genes. Development.* 20:537-542.
178. Robert, S., Chary, SN., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, NV., Hicks, GR. (2008). **Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105(24):8464-9.
179. Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E, *et al.* (2010). **ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis.** *Cell.* 143, 111-121.
180. Robinson, DG., Jiang, L., Schumacker, K. (2008). **The endosomal system of plants: charting new and familiar territories.** *Plant Physiology.* 147, 1482-1492.
181. Rocco, M., Corrado, G., Arena, S., D'Ambrosio, C., Tortiglione, C., Sellaroli, S., Marra, M., Rao, R., Scaloni, A. (2008). **The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire.** *Journal of Proteomics.* 71:176-185.
182. Ron, M., Avni, A. (2004). **The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato.** *The Plant Cell.* 16, 1604-1615.
183. Roy, S., Liu, W., Sekhar-Nandety, R., Crook, A., Mysore, KS., Pislariu, CI., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, MK. (2020). **Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation.** *Plant Cell.* 32(1):15-41.
184. Russinova, E., Borst, JW., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., de Vries, SC. (2004). **Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1).** *Plant Cell.* 16(12):3216-29.
185. Saha, S., Dutta, A., Bhattacharya, A., DasGupta, M. (2014). **Intracellular catalytic domain of symbiosis receptor kinase hyperactivates spontaneous nodulation in absence of rhizobia.** *Plant Physiology.* 166, 1699-1708.

186. Saha, S., Paul, A., Herring, L., Dutta, A., Bhattacharya, A., Samaddar, S., Goshe, MB., DasGupta, M. (2016). **Gatekeeper tyrosine phosphorylation of SYMRK is essential for synchronizing the epidermal and cortical responses in root nodule symbiosis.** *Plant Physiology*. 171, 71-81.
187. Salazar-Henao, J. E., Vélez-Bermúdez, I. C., & Schmidt, W. (2016). **The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis.** *Development (Cambridge)*, 143(11), 1848–1858.
188. Samaddar, S., Dutta, A., Sinharoy, S., Paul, A., Bhattacharya, A., Saha, S., Chien, KY., Goshe, MB., DasGupta, M. (2013). **Autophosphorylation of gatekeeper tyrosine by symbiosis receptor kinase.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 587, 2972-2979.
189. Sánchez-López, R., Jáuregui, D., Nava, N., Alvarado-Affantranger, X., Montiel, J., Santana, O., Sánchez, F., Quinto, C. (2011). **Down-regulation of SYMRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules.** *Plant, Cell and Environment*. 34:2109-2121.
190. Sassmann, S., Rodrigues, C., Milne, S.W., Nenninger, A., Allwood, E., Littlejohn, G.R., Talbot, N.J., Soeller, C., Davies, B., Hussey, P.J., Deeks, M.J. (2018). **An immune-responsive cytoskeletal-plasma membrane feedback loop in plants.** *Current Biology*. 28(13):2136-2144.e7.
191. Schallus, T., Jaeckh, C., Fehér, K., Palma, AS., Liu, Y., Simpson, JC., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, TJ., Feizi, T., Pieler, T., Muhle-Goll, C. (2008). **Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation.** *Molecular Biology of the Cell*. 19:3404-3414.
192. Schneider, A., Walker, SA., Poyser, S., Sagan, M., Ellis, TH., Downie, JA. (1999). **Genetic mapping and functional analysis of a nodulation-defective mutant (sym19) of pea (*Pisum sativum* L.).** *Molecular and General Genetic*. 262:1-11.
193. Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, AK., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., Chinchilla, D. (2010). **Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1.** *The Journal of Biological Chemistry*. 285(13), 9444-9451.
194. Schwihla, M., Korbei, B. (2020). **The Beginning of the End: Initial Steps in the Degradation of Plasma Membrane Proteins.** *Frontiers in Plant Science*. 21; 11:680.
195. Seto, ES., Bellen, HJ., Lloyd, TE. (2002). **When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways.** *Genes Development*. 16:1314-1336.
196. Sharfman, M., Bar, M., Ehrlich, M., Schuster, S., Melech-Bonfil, S., Ezer, R., Sessa, G., Avni, A. (2011). **Endosomal signaling of the tomato leucine-reach repeat receptor-like protein LeEix2.** *The Plant Journal*. 68, 413-423.
197. Shaw, SL., Long, SR. (2003). **Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells.** *Plant Physiology*. 131, 976-984.

198. Shen, B., Li, C., Min, Z., Meeley, RB., Tarczynski, MC., Olsen, OA. (2003). **Sal1 determines the number of aleurone cell layers in maize endosperm and encodes a class E vacuolar sorting protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100:6552-6557.
199. Shope, JC., DeWald, DB., Mott, KA. (2003). **Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization.** *Plant Physiology.* 133:1314-1321.
200. Sieberer, B., Emons, AMC. (2000). **Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors.** *Protoplasma.* 214, 118-127.
201. Silady, RA., Kato, T., Lukowitz, W., Sieber, P., Tasaka, M., Somerville, CR. (2004). **The gravitropism defective 2 mutants of *Arabidopsis* are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*.** *Plant Physiology.* 136:3095-3103.
202. Smith, JM., Salamango, DJ., Leslie, ME., Collins, CA., Heese, A. (2014). **Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN-SENSING2.** *Plant Physiology.* 164(1):440-54.
203. Son, O., Yang, HS., Lee, HJ., Lee, MY., Shin, KH. (2003). **Expression of *srab7* and *SCaM* genes required for endocytosis of *Rhizobium* in root nodules.** *Plant Science.* 165:1239-44
204. Song, WY., Wang, GL., Chen, LL, *et al.* (1995). **A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.** *Science.* 270(5243), 1804-1806.
205. Sorkin, A. (2004). **Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort.** *Current Opinion Cell Biology.* 16:392-399.
206. Spallek, T., Beck, M., Ben Khaled, S., Salomon, S., Bourdais, G., Schellmann, S., Robatzek, S. (2013). **ESCRT-I mediates FLS2 endosomal sorting and plant immunity.** *Public Library of Science Genetic.*
207. Stéger, A., & Palmgren, M. (2022). **Root hair growth from the pH point of view.** *Frontiers in Plant Science,* 13.
208. Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, CL., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., Jürgens, G. (1999). **Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF.** *Science.* 286:316-318.
209. Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., Parniske, M. (2002). **A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis.** *Nature.* 417:959-962.
210. Sutter, JU., Sieben, C., Hartel, A., Eisenach, C., Thiel, G., Blatt, MR. (2007). **Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane.** *Current Biology.* 17:1396-1402.
211. Takáč, T., Pechan, T., Samajová, O., Samaj, J. (2013). **Vesicular trafficking and stress response coupled to PI3K inhibition by LY294002**

- as revealed by proteomic and cell biological analysis. *Journal of Proteome Research*. 12(10):4435-48.
212. Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wiren, N., Fujiwara, T. (2005). **Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:12276-12281.
213. Takano, T., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T. (2010). **Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (11), 5220-5225.
214. Tanaka, H., Watanabe, M., Watanabe, D., Tanaka, T., Machida, C., Machida, Y. (2002). **ACR4, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana*, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis.** *Plant and Cell Physiology*. 43(4), 419-428.
215. Timmers, A.C. (2008). **The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia.** *Journal of Microscopy*. 231(2):247–256.
216. Traub, LM., Bonifacino, JS. (2013). **Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5, a016790.
217. Tse, YC., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, SW., Robinson, DG., Jiang, L. (2004). **Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells.** *Plant Cell*. 16:672-693.
218. Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Nakano, A. (2001). **Ara6, a plant unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *European Molecular Biology Organization Journal*. 20:4730-4741.
219. Vasan, S., Srivastava, D., Cahill, D., Singh, P.P., Adholeya, A. (2021). **Important innate differences in determining symbiotic responsiveness in host and non-hosts of arbuscular mycorrhiza.** *Scientific Reports*. 14;11(1):14444.
220. Vidali, L., Rounds, CM., Hepler, PK., Bezanilla, M. (2009). **Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells.** *Public Library of Science one*. 4:5744.
221. Voigt, B., Timmers, AC., Samaj, J., Hlavacka, A., Ueda, T., Preuss, M., Nielsen, E., Mathur, J., Emans, N., Stenmark, H., Nakano, A., Baluska, F., Menzel, D. (2005). **Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs.** *European Journal of Cell Biology*. 84(6):609-21.
222. Wais, R., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penrnetsa, R., Cook, D., Gough, C., Denarié, J., Long, S. (2000). **Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:13407-13412.
223. Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, SY., Pan, J. (2013a). **Clathrin light chains regulate clathrin-**

- mediated trafficking, auxin signaling, and development in Arabidopsis.** *Plant Cell.* 25(2):499-516.
224. Wang, H., Zhuang, X., Cai, Y., Cheung, AY., Jiang, L. (2013b). **Apical F-actin-regulated exocytic targeting of NtPPME1 is essential for construction and rigidity of the pollen tube cell wall.** *Plant Journal.* 76(3):367-79.
225. Wang, J., Lian, N., Zhang, Y., Man, Y., Chen, L., Yang, H., Lin, J., Jing, Y. (2022). **The cytoskeleton in plant immunity: dynamics, regulation, and function.** *International Journal of Molecular Sciences.* 23(24):15553.
226. Wang, JG., Li, S., Zhao, XY., Zhou, LZ., Huang, GQ., Feng, C., Zhang, Y. (2013c). **HAPLESS13, the Arabidopsis μ 1 adaptin, is essential for protein sorting at the trans-Golgi network/early endosome.** *Plant Physiology.* 162(4):1897-910.
227. Wang, S., Yoshinari, A., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Mitani-Ueno, N., Ma, JF., Naito, S., Takano, J. (2017). **Polar localization of the NIP5;1 boric acid channel is maintained by endocytosis and facilitates boron transport in Arabidopsis roots.** *The Plant Cell.* 29, 824-842.
228. Wang, X., Goshe, MB., Soderblom, EJ., Phinney, BS., Kuchar, JA., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, SC., Clouse, SD. (2005). **Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase.** *The Plant Cell.* 17, 1685-1703.
229. Xi, L., Wu, XN., Gilbert, M., Schulze, WX. (2019). **Classification and interactions of LRR receptors and co-receptors within the Arabidopsis plasma membrane -An overview.** *Frontiers in Plant Science.* 10, 472.
230. Xu, XL., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., London, E. (2001). **Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts).** *The Journal of Biological Chemistry.* 276:33540-46.
231. Xue, S., Zou, J., Liu, Y., Wang, M., Zhang, C., Le, J. (2019). **Involvement of BIG5 and BIG3 in BRI1 trafficking reveals diverse functions of BIG-subfamily ARF-GEFs in plant growth and gravitropism.** *International Journal of Molecular Sciences.* 20, 2339.
232. Yamamoto, M., Nishio, T., Nasrallah, JB. (2018). **Activation of self-incompatibility signaling in transgenic *Arabidopsis thaliana* is independent of AP2-based clathrin-mediated endocytosis.** *G3 (Bethesda).* 8(7), 2231-2239.
233. Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2022). **Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses.** *Journal of Integrative Plant Biology,* 64(2), 244–267.
234. Yang, Z. (2002). **Small GTPases: versatile signaling switches in plants.** *Plant Cell.* 14: S375-S388.
235. Yeh, YH., Panzeri, D., Kadota, Y, *et al.* (2016). **The Arabidopsis malectin-Like/LRR-RLK IOS1 is critical for BAK1-dependent and BAK1-independent pattern-triggered immunity.** *The Plant Cell.* 28, 1701-1721.

236. Yokota, K., Fukai, E., Madsen, LH, *et al.* (2009). **Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*.** *The Plant Cell*. 21, 267-284.
237. Yoshida, S y Parniske, M. (2005). **Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation.** *Journal of Biological Chemistry*. 280:9203-9209.
238. Yoshinari, A., Kasai, K., Fujiwara, T., Naito, S., Takano, J. (2012). **Polar localization and endocytic degradation of a boron transporter, BOR1, is dependent on specific tyrosine residues.** *Plant Signal and Behavior*. 7(1):46-9.
239. Yoshinari, A., Toda, Y., Takano, J. (2021). **GNOM-dependent endocytosis maintains polar localisation of the borate exporter BOR1 in Arabidopsis.** *Biology of the Cell*. 113(5), 264-269.
240. Yu, M., Li, R., Cui, Y, *et al.*, (2020). **The RALF1-FERONIA interaction modulates endocytosis to mediate control of root growth in Arabidopsis.** *Development*. 147, dev189902.
241. Yu, Q., Hlavacka, A., Match, T., Volkmann, D., Menzel, D., Goldbach, HE., Baluska, F. (2002). **Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices.** *Plant Physiology*. 130:415-421.
242. Yuan, S., Zhu, H., Gou, H., Fu, W., Liu, L., Chen, T., Ke, D., Kang, H., Xie, Q., Hong, Z., Zhang, Z. (2012). **A Ubiquitin Ligase of Symbiosis Receptor Kinase Involved in Nodule Organogenesis.** *Plant Physiology*. 160:106-117.
243. Zhou, J., Liu, D., Wang, P, *et al.*, (2018). **Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(8), E1906-E1915.
244. Zhu, H., Chen, T., Zhu, M., Fang, Q., Kang, H., Hong, Z., Zhang, Z. (2008). **A novel ARID DNA-binding protein interacts with SYMRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*.** *Plant Physiology*. 148:337-347.
245. Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, JDG., Boller, T., Felix, G. (2006). **Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation.** *Cell*. 125, 749-760.
246. Zipfel, C., Oldroyd, G.E. (2017). **Plant signalling in symbiosis and immunity.** *Nature*. 543(7645):328–336.
247. Zuo, J., Niu, QW., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., Chua, NH. (2000). **KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4-b-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis.** *The Plant Cell*. 12, 1137-1152.
248. Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, YW., Nodzyński, T. (2019). **The nuts and bolts of PIN auxin efflux carriers.** *Frontiers in Plant Science*. 10, 985.

11.- ANEXOS

ANEXO 1

11.1 Generación de la construcción pPvSYM_{35S}::PvSYM_{35S}-EGFP con marcador de selección LifeAct-Turquoise2.

En ensayos previos usando la construcción ilustrada en la Fig. 16, la cual dirige la expresión del cassette pPvSYM_{35S}::PvSYM_{35S}-EGFP, se encontró que la fluorescencia emitida por la quimera PvSYM_{35S}-EGFP (≈130 kDa) no es lo suficientemente intensa para distinguir y disectar las raíces no transgénicas de las transgénicas. Por lo cual, se decidió generar una estrategia para co-expresar un marcador de selección fluorescente y pPvSYM_{35S}::PvSYM_{35S}-EGFP de manera independiente en el mismo vector.

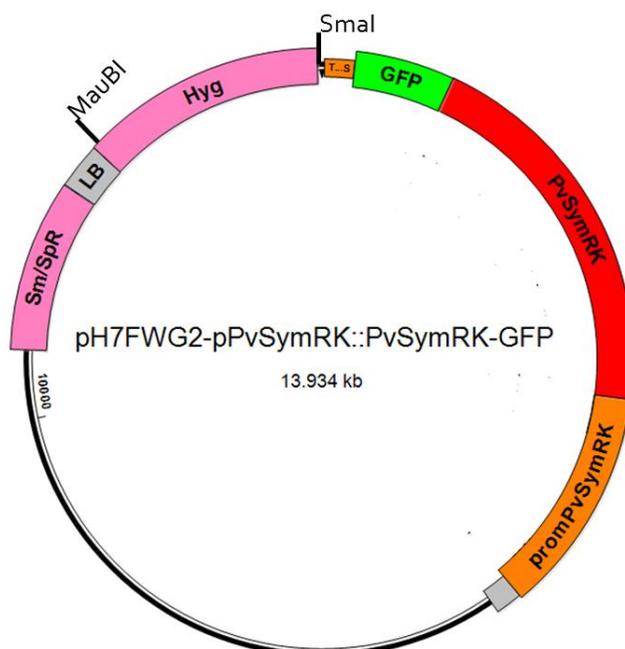


Figura 16. Esquema del vector de expresión pH7FWG2-pPvSYM_{35S}::PvSYM_{35S}-EGFP.

11.1.1 Generación de la construcción 35S::LifeAct-Turquoise2.

El primer paso fue seleccionar una proteína fluorescente como marcador de selección. Entre las proteínas fluorescentes de elección, nos hemos limitado a aquellas cuyos cassettes de expresión están disponibles en nuestra institución de trabajo. El segundo criterio está relacionado con la posibilidad de analizar en paralelo la distribución del marcador FM4@-64 (fluorescente en rojo, ver Tabla 3) en pelos radicales que expresen PvSYM_{35S}-EGFP, por lo cual, hemos optado por expresar a la proteína Turquoise2 (fluorescente en azul, Tabla 3) en la siguiente modalidad: fusionada al péptido de unión a actina, LifeAct (Vidali *et al.*, 2009, Tesis de Maestría de Alfredo Bañuelos, 2012), de donde, además de servir como

marcador de selección, la quimera LifeAct-Turquoise2 permitirá analizar la dinámica de PvSYMRK-EGFP con respecto al citoesqueleto de actina.

Tabla 3. Espectros de excitación y emisión de sondas fluorescentes a utilizar en este trabajo.

Sonda Fluorescente	λ_{ext} (nm)	λ_{emi} (nm)
FM4@64	515	640
EGFP	495	515
Turquoise2	434	474

En la estrategia diseñada, la expresión del cassette quimérico LifeAct-Turquoise2 esta bajo el control transcripcional del promotor constitutivo 35S. La generación de esta construcción se llevó a cabo por PCR utilizando como templado el plásmido pmTurquoise2-ER (Goedhart *et al.*, 2012; que codifica para Turquoise2 con secuencia de retención en retículo endoplásmico o KDEL), amablemente donado por el Dr. Takuya Nishigaki (IBT-UNAM), como a continuación se describe:

- 1) Para generar un fragmento de DNA quimérico que codifique para la proteína de fusión LifeAct-Turquoise2, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (ver Tabla 2 y Fig. 17): a) LifeAct LUP, mega oligonucleótido cuyo extremo 5' comprende los 51 nucleótidos que codifican para Life-Act, en fase de lectura abierta con los 15 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia codificante de Turquoise2. b) mCherry LW, oligonucleótido complementario (*anti-sentido*) al extremo 3' de la secuencia codificante de Turquoise2 (sin terminación KDEL) e introduce un codón de paro.

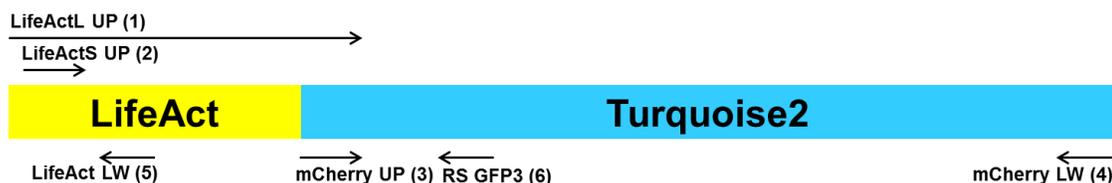


Figura 17. Esquema de la quimera LifeAct-Turquoise2. En amarillo se ilustra la secuencia correspondiente a LifeAct, y en azul la secuencia de Turquoise2. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos empleados para la generación y análisis de la construcción LifeAct-Turquoise2, y el número entre paréntesis corresponde al número indicado en la Tabla 2.

- 2) La amplificación por PCR de LifeAct-Turquoise2 resultó en un producto de 772 pb (Fig. 18), el cual fue clonado en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) para generar la construcción pENTR-LifeAct-Turquoise2, mediante transformación en *E. coli* DH5α. El análisis por PCR en colonia con los oligonucleótidos LifeActSUP y M13 *reverse* (específico de pENTR™/D TOPO®) permitió la identificación de dos clonas positivas (clonas pENTR-LifeAct-Turquoise2.6 y pENTR-LifeAct-Turquoise2.8, Fig. 19). La identidad del inserto en plásmidos aislados de ambas clonas (Fig. 20) fue confirmado por PCR usando los juegos de oligonucleótidos LifeAct LUP y

mCherry LW, y LifeAct SUP en combinación con M13 *reverse* (Fig. 20 b y c), y secuenciación. La Fig. 21 a ilustra la construcción resultante.

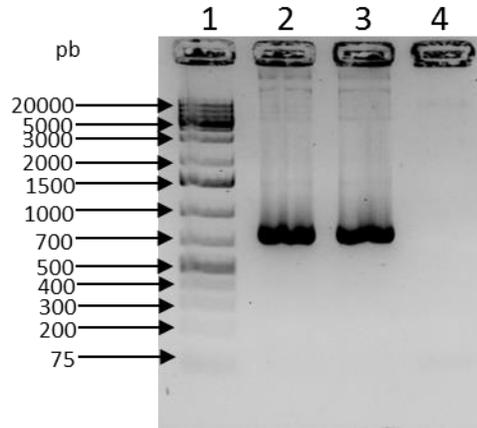


Figura 18. Amplificación de LifeAct-Turquoise2 por PCR. El fragmento se amplificó usando los oligonucleótidos LifeAct LUP y mCherry LW, y como templado el plásmido pmTurquoise2-ER. Carriles: 1; marcador de peso molecular (kb), 2 y 3; producto de PCR LifeAct-Turquoise2 (772 pb), y 4; control negativo (sin templado).

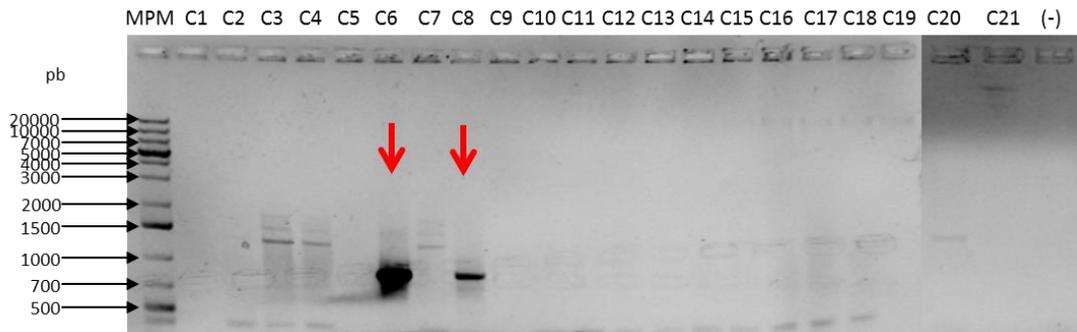


Figura 19. Análisis por PCR en colonia de la clonación del fragmento LifeAct-Turquoise2 en pENTR™/D TOPO®. Oligonucleótidos usados LifeAct SUP y M13 *reverse*. Amplicón de 941 pb. Colonias analizadas: C1-C21. (-): control negativo, sin templado. Las flechas indican las colonias positivas, C6 y C8.

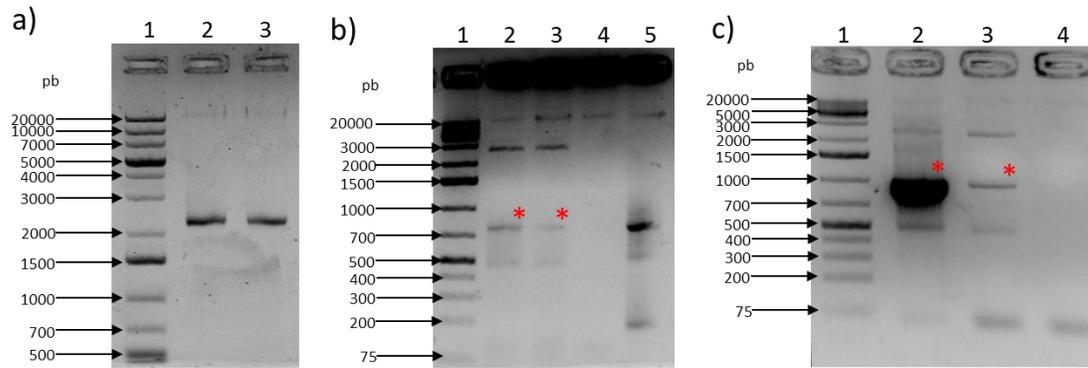


Figura 20. Confirmación de identidad de las clonas pENTR-LifeAct-Turquoise2.6 y pENTR-LifeAct-Turquoise2.8. a) Plásmidos purificados. Análisis por PCR con oligonucleótidos: b) LifeAct LUP y mCherry LW, producto esperado de 772 pb, c) LifeAct SUP y M13 reverse, producto esperado de 941 pb. Carriles: 1, marcador de peso molecular (pb); 2, clona pENTR-LifeAct-Turquoise2.6; 3, clona pENTR-LifeAct-Turquoise2.8; 4, control negativo, sin templado; 5, control positivo (re-amplificación de producto en Fig. 26, pozo 2. Los asteriscos indican el producto de amplificación esperado.

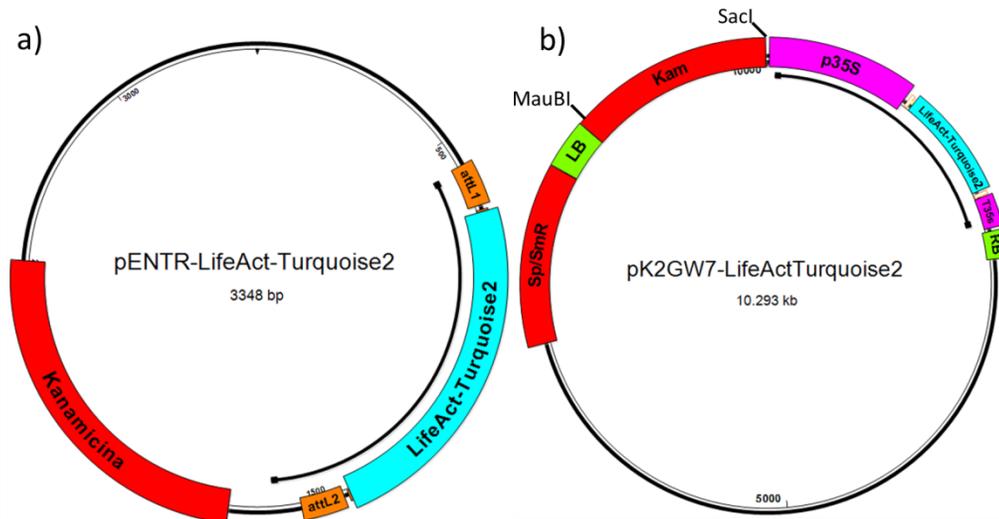


Figura 21. Representación *in silico* de las construcciones a) pENTR-LifeAct-Turquoise2 y b) pK2FGW7-LifeAct-Turquoise2. En cada caso la línea negra interna indica la cobertura obtenida por secuenciación de DNA.

- 3) Se seleccionó la clona pENTR-LifeAct-Turquoise2.6 para proceder a la recombinación (con LR clonase® II, Invitrogen), del inserto LifeAct-Turquoise2 en el vector de expresión en plantas pK2GW7. En la construcción resultante pK2GW7-LifeAct-Turquoise2 (Fig. 21 b), la expresión de LifeAct-Turquoise2 esta bajo control del promotor constitutivo 35S y la secuencia de

terminación T35S. La mezcla de recombinación fue transformada en *E. coli* DH5 α y las colonias fueron analizadas por PCR en colonia usando los oligonucleótidos LifeAct SUP y mCherry LW (Fig. 22 a). Tres colonias fueron seleccionadas (pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8, pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.9 y pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.10) y analizadas en detalle por PCR usando diferentes juegos de oligonucleótidos (Fig. 22 b). La identidad del fragmento recombinado se confirmó por secuenciación.

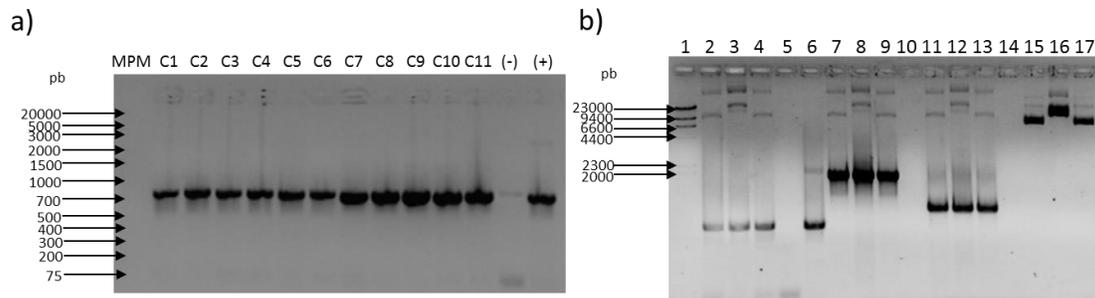


Figura 22. Análisis de la construcción pK2GW7-LifeAct-Turquoise2. A) Identificación de clonas positivas por PCR en colonia usando oligonucleótidos LifeAct SUP y mCherry LW, producto esperado de 768 pb. Colonias analizadas C1-C11. (-), control negativo, sin templado; (+), control positivo (templado): pENTR-LifeAct-Turquoise2.6. Tres clonas positivas fueron seleccionadas: pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8, pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.9 y pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.10. b) Análisis de clonas positivas por PCR con oligonucleótidos: LifeAct SUP y mCherry LW, tamaño esperado de 768 pb, carriles 2-6; Rs35SUP y mCherry LW, tamaño esperado de 1824 pb, carriles 7-10; Rsk2LW y LifeAct LUP, tamaño esperado de 1000 pb; carriles 11-14. Carril 1: marcador de peso molecular de DNA (pb). Carriles 2, 7, 11 y 15: clona pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. Carriles 3, 8, 12 y 16: clona pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.9. Carriles 4, 9, 13 y 17: clona pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.10. Carriles 5, 10 y 14: control negativo, sin templado.

11.1.2 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2 en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con *Agrobacterium tumefaciens*.

Para analizar la funcionalidad de la construcción LifeAct-Turquoise2, se utilizó el sistema de agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* con clonas de *A. tumefaciens* cepa GB1301 (amablemente donadas por la Dra. Rosario Vera) que portan la construcción pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. Este es un método de transformación y expresión transitoria, ampliamente utilizado debido a su sencillez, rapidez y fácil análisis por microscopía de fluorescencia cuando el marcador reportero es alguna proteína fluorescente (D'Aoust *et al.*, 2008).

Para los ensayos de agroinfiltración y expresión transitoria en hojas de tabaco, se seleccionaron varias clonas de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8 (Fig. 23).

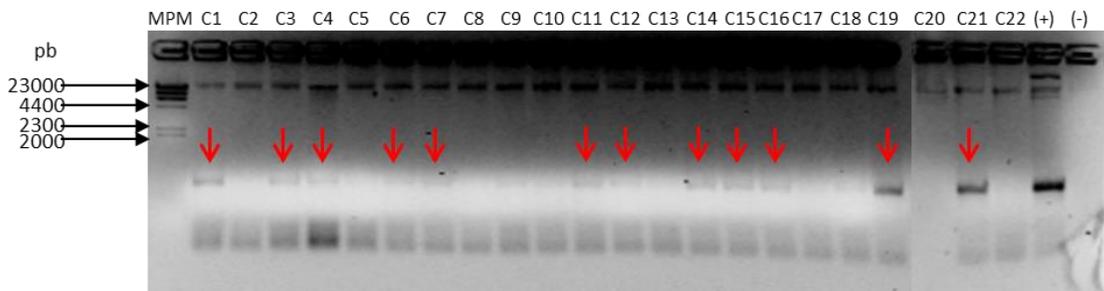


Figura 23. Análisis por PCR en colonias de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GB1301 transformada con la construcción pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8, usando oligonucleótidos LifeAct LUP y mCherry LW. El tamaño del producto esperado es de 772 pb. Colonias analizadas C1-C22. Las flechas indican las colonias positivas. (+), control positivo: plásmido pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8. (-), control negativo, sin templado.

La observación de las células del pavimento de segmentos de hojas transformadas (48 h después de la agroinfiltración) se realizó por microscopía de epifluorescencia y de luz transmitida. El flujo citoplasmático observado por microscopía de luz transmitida (campo claro) permitió confirmar que las células agroinfiltradas estaban vivas. El análisis por microscopía de epifluorescencia de segmentos de hojas independientes agroinfiltradas con pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8 mostró pequeñas zonas de fluorescencia (Fig. 24), lo que indica que la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2 se expresa. La fluorescencia detectada es intracelular, difusa y altamente dinámica, se distribuyó principalmente en la región cortical de las células del pavimento, marcando el citoesqueleto de actina cortical, y se detectó formando parte de los microfilamentos de actina transcelulares, observados como delgados hilos que cruzan la célula (Fig. 24, ver flechas rojas), cuya dinámica se aprecia al analizar imágenes en serie, tomadas cada 15 segundos durante 5 min. En su conjunto estos resultados confirmaron que la construcción pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8 dirige la expresión de la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2.

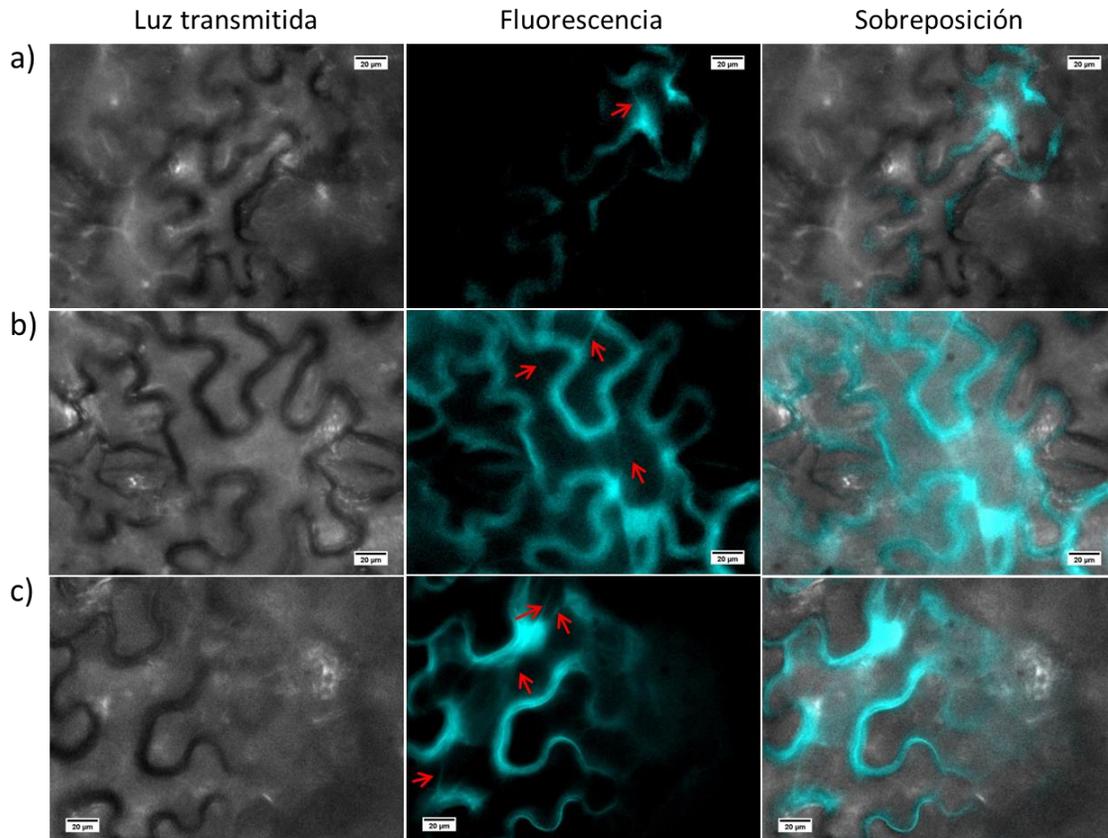


Figura 24. Análisis por microscopía de epifluorescencia de células de pavimento de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. a-c) Secciones de diferentes hojas agroinfiltradas. Flechas rojas: indican microfilamentos de actina transcelulares. La escala representa 20 μm .

11.1.3 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente LifeAct-Turquoise2 en raíces transgénicas de frijol.

Continuando con la validación de funcionalidad de la construcción pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8 se generaron raíces transgénicas de frijol mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 que portan esta construcción (Fig. 25).

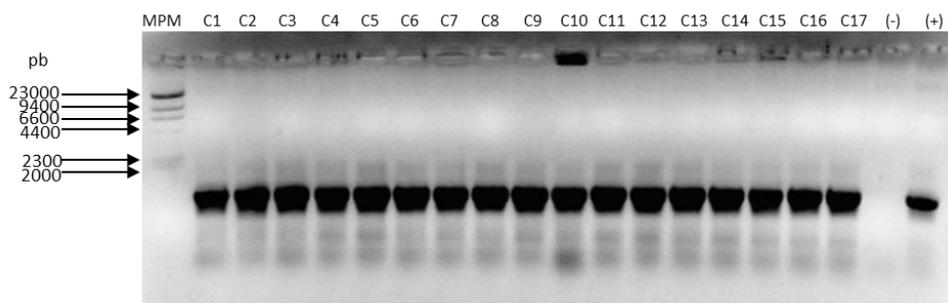


Figura 25. Análisis por PCR en colonias de *A. rhizogenes* cepa K599 transformada con la construcción pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8, usando los oligonucleótidos LifeAct LUP y mCherry LW. El tamaño del producto esperado es de 772 pb. Colonias analizadas C1-C17.

(+), Control positivo: plásmido pK2GW7::LifeAct-Turquoise2.8. (-), control negativo, sin templado.

Las raíces pilosas (o “hairy roots”) se generaron según lo descrito en la sección Metodología y se analizaron por estereomicroscopía de epifluorescencia con el objetivo de identificar cuales raíces presentaban fluorescencia asociada a Turquoise2, es decir, eran transgénicas. El análisis minucioso de las raíces pilosas mostró que aproximadamente el 20% de las raíces generadas fueron transgénicas (Fig. 26 b-f). Mientras que las raíces pilosas generadas con la cepa *A. rhizogenes* K599 no transformada, no presentaron fluorescencia (Fig. 26 a). En conclusión, LifeAct-Turquoise2 es un buen marcador de selección de raíces transgénicas.

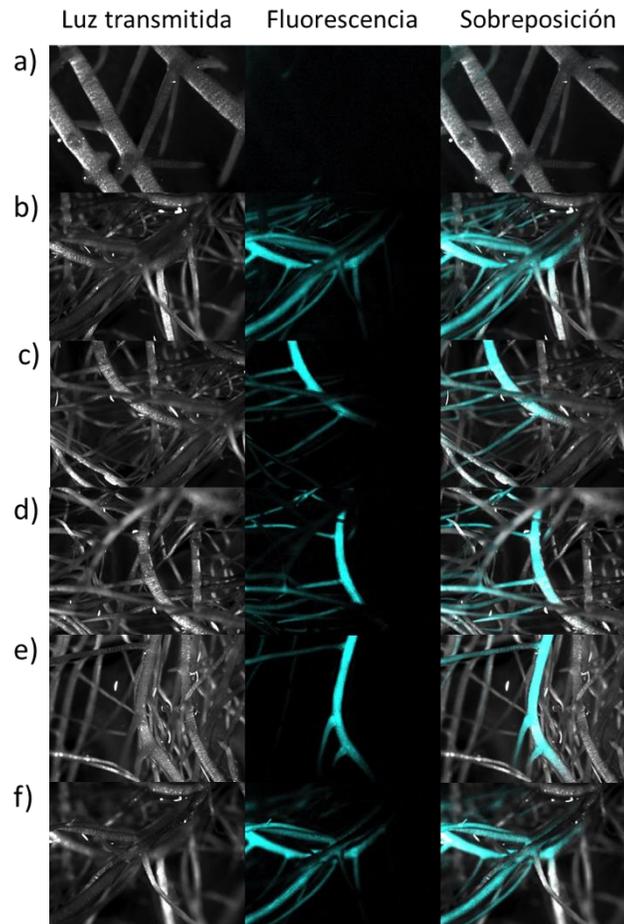


Figura 26. Análisis por estereomicroscopía de epifluorescencia de raíces pilosas de frijol transformadas con clones de *A. rhizogenes* K599 que portan pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. a) Raíces pilosas control generadas con la cepa *A. rhizogenes* K599 no transformada; b-f) raíces pilosas generadas con clones de *A. rhizogenes* que portan pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. Las raíces que fluorescen en azul son transgénicas.

En seguida se analizaron, por microscopía de epifluorescencia, los pelos radicales de las raíces transformadas. La señal fluorescente se encontró asociada a los filamentos de actina que forman una red dinámica que se extienden a lo largo del pelo radical (Fig. 27 a y b). Estos resultados son similares a los reportados en la

Tesis de Maestría de Alfredo Bañuelos (2012), en donde el péptido de unión a actina LifeAct está fusionado a las proteínas fluorescentes mCherry o mEGFP. Los resultados obtenidos indican que LifeAct-Turquoise2 es una herramienta útil, no solo para seleccionar pelos radicales transgénicos, sino también para estudiar la distribución y dinámica *in vivo* del citoesqueleto de actina en pelos radicales de *P. vulgaris*.

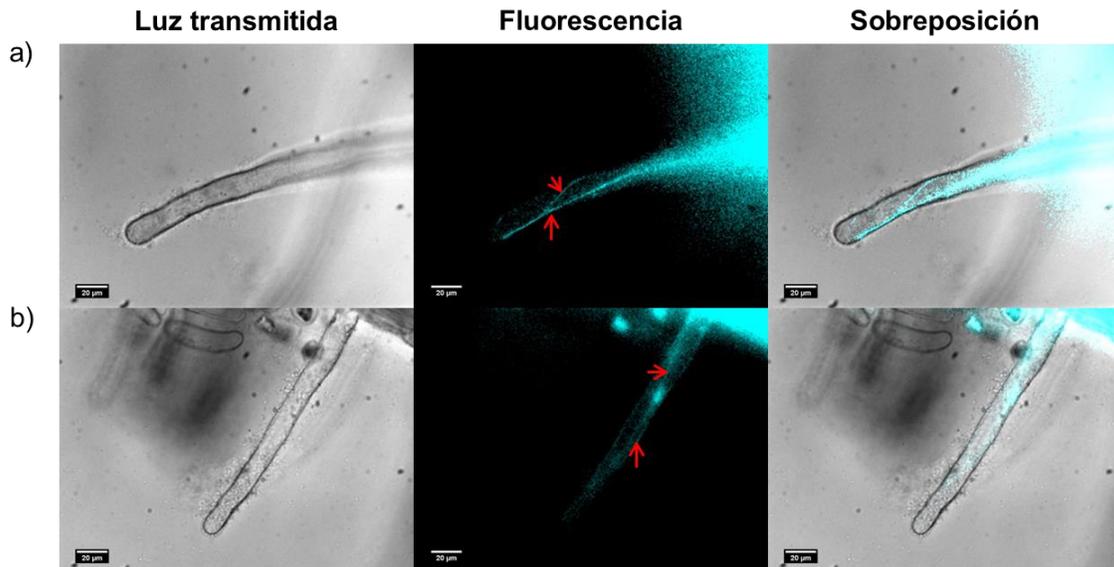


Figura 27. Análisis por microscopía *in vivo* de epifluorescencia de pelos radicales transgénicos de *P. vulgaris*, que expresan LifeAct-Turquoise2. A y b) Pelos radicales de raíces de *P. vulgaris* transformadas con clones de *A. rhizogenes* K599 que portan pK2GW7-LifeAct-Turquoise2.8. Las flechas indican los filamentos de actina asociados a LifeAct-Turquoise2. La escala representa 20 µm.

11.1.4 Clonación de pPvSYMRK::PvSYMRK en pK2GW7-LifeAct-Turquoise2

Una vez que se analizó la funcionalidad del marcador fluorescente LifeAct-Turquoise2 en hojas de tabaco agroinfiltradas y en pelos radicales transgénicos de frijol, el siguiente paso fue amplificar por PCR el fragmento pPvSYMRK::PvSYMRKGFP-T35S presente en la construcción pH7FWG2-pPvSYMRK::PvSYMRK-GFP para después clonarlo entre los sitios de restricción *Mau*BI y *Sac*I del plásmido pK2FGW7-LifeAct-Turquoise2 (Fig. 21) como a continuación se describe:

- 1) Para la amplificación del fragmento pPvSYMRK::PvSYMRK, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (ver Tabla 2): a) MaupPvRLK-H5', oligonucleótido cuyo extremo 5' contiene la secuencia CACC para su clonación en pENTR™/D TOPO® y el sitio de restricción *Mau*BI. B) PvECICGFP3Sma, oligonucleótido *anti*-sentido cuyo extremo 3' contiene el sitio de restricción *Sma*I.

2) La amplificación por PCR del fragmento pPvSYMRK::PvSYMRK resultó en un producto de 4410 pb (Fig. 28 a), el cual fue clonado (amplicón en carril 1 Fig. 28 a) en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) para generar la construcción pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma, mediante transformación en *E. coli* DH5α. El análisis por PCR en colonia con los oligonucleótidos RL3-2 y RL7-2 (específicos de *PvSYMRK*) permitió la identificación de dos clonas positivas (clonas pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3 y pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma5, Fig. 28 b). La identidad del inserto en plásmidos aislados solo se confirmó en la clona pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3 por digestión enzimática con *Mau*BI y *Sma*I (Fig. 28 c) y secuenciación (Fig. 29).

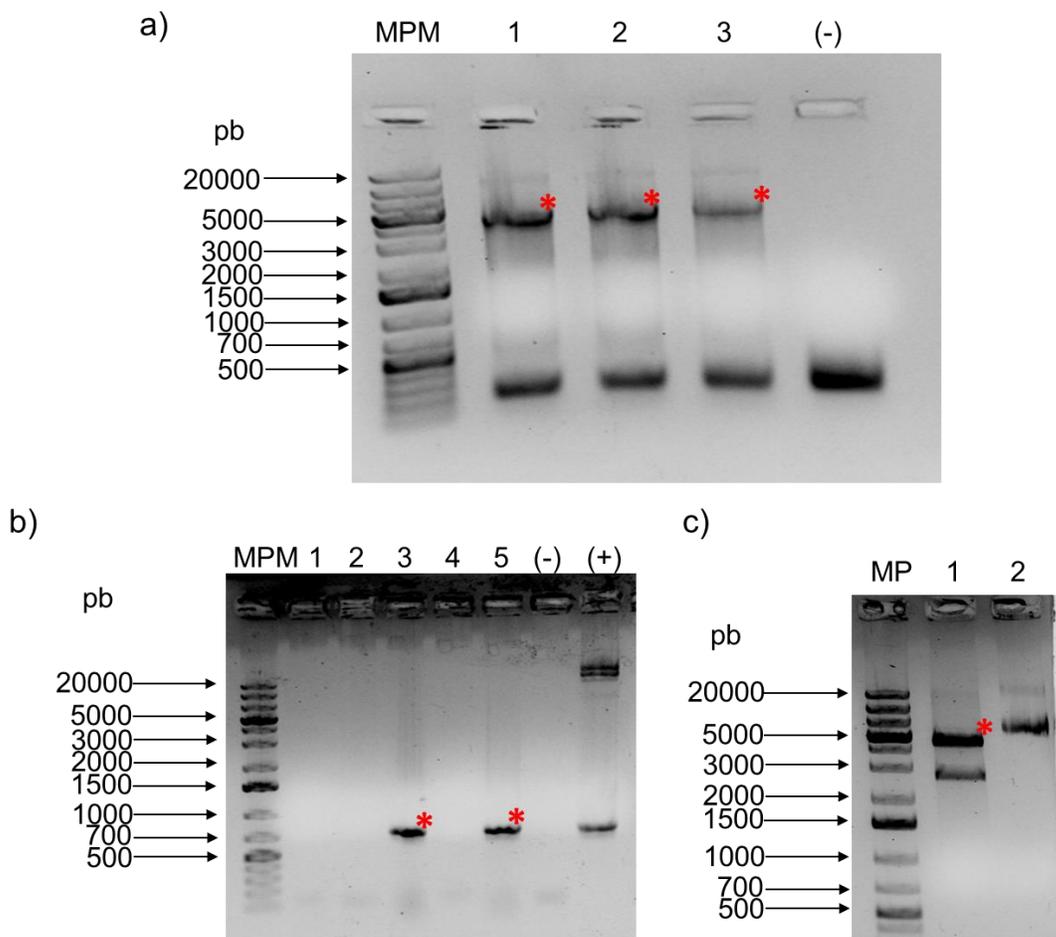


Figura 28. Etapas de amplificación y clonación de pPvSYMRK::PvSYMRK en pENTR. A) Amplificación de pPvSYMRK::PvSYMRK por PCR en gradiente de temperatura a 1) 60°C, 2) 62°C y 3) 64°C. El fragmento se amplificó usando los oligonucleótidos MaupPvRLK-H5' y PvECICGFP3Sma y como templado el plásmido pH7FWG2-pPvSYMRK::PvSYMRK-GFP. Carriles: MPM; marcador de peso molecular (kb), 1-3; producto de PCR pPvSYMRK::PvSYMRK (4410 pb), y (-); control negativo (sin templado). B) Análisis por PCR en colonia de la clonación del fragmento MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma en pENTR™/D TOPO®. Oligonucleótidos usados RL3-2 y RL7-2. Amplicón de 703 pb. Colonias

analizadas: 1-5. (-): control negativo, sin templado. Los asteriscos indican las colonias positivas, 3 y 5. C) Digestión enzimática de pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3 con *MauBI* y *SmaI* a 30°C y 37°C consecutivamente por 2 horas, 1) producto liberado de 4420 pb correspondiente a pPvSYMRK::PvSYMRK, asterisco rojo, 2) plásmido sin digerir.

3) El plásmido pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3 (Fig. 29) se utilizó para recombinar el inserto MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma en el vector de expresión en plantas pK2GW7 y de este modo generar el cassette MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFP-Ter35S, se obtuvieron 3 colonias positivas (pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol1-3 Fig. 30 a), de las cuales solo las colonias 1 y 2 resultaron ser verdaderas positivas (revelado por digestión enzimática con *MauBI* y *SmaI*, dato no mostrado); la identidad de los vectores pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol1-2 se confirmó por PCR usando diferentes juegos de oligonucleótidos (Fig. 30 b) y por secuenciación (dato no mostrado).

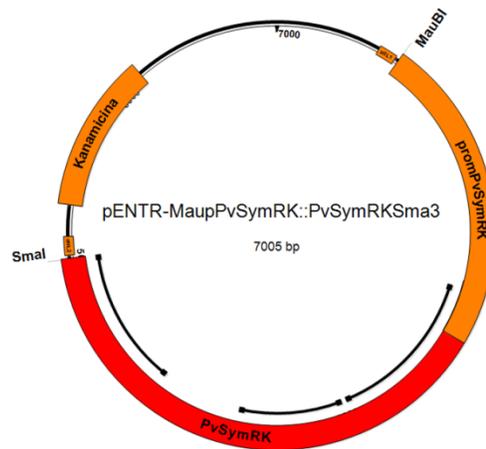


Figura 29. Representación *in silico* de la construcción pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3, las líneas negras interna indica la cobertura obtenida por secuenciación de DNA.

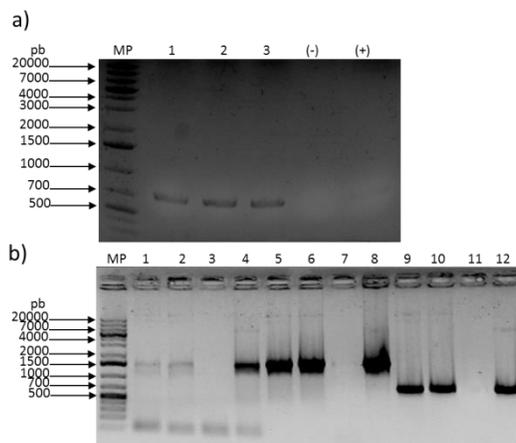


Figura 30. Etapas de recombinación de MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma en el vector de expresión en plantas pK2GW7. A) PCR en colonia de clonas 1) pH7FWG2-

MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol1, 2) pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol2 y 3) pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol3; usando los oligos RL3-4 y PvECIGFP3, amplicón de 688 pb, (-) control negativo sin templado, (+) control positivo clona pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3. B) Análisis de clonas positivas por PCR con oligonucleótidos: carriles 1-4 oligonucleotidos pPvRLKH5' y GW3RLK, amplicón de 1460 pb, carriles 5-8 oligonucleotidos RL3-1 y RL7-2, amplicón de 1495 pb, carriles 9-12 oligonucleotidos RL3-2 y RL7-2, amplicón de 694 pb. Carriles 1, 5 y 9 Clona pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol1, carriles 2, 6 y 10 clona pH7FWG2-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaCol2, carriles 3, 7 y 11 control negativo sin templado, carriles 4, 8 y 12 control positivo clona pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSma3.

- 4) Posteriormente se amplificó por PCR el fragmento MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFP-Ter35S utilizando los oligos MaupPvRLK-H5' y T35S-SacI que se ancla al Ter35S y que además incluye el sitio de restricción SacI, el producto de PCR (Fig. 31 a), se clonó en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) para generar la construcción pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac, mediante transformación en *E. coli* DH5α. El análisis por PCR en colonia, mostró que sólo una clona fue positiva (dato no mostrado), pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35SsacCol1, la cual se confirmó su identidad por digestión enzimática con MauBI y SacI (Fig. 31 b).

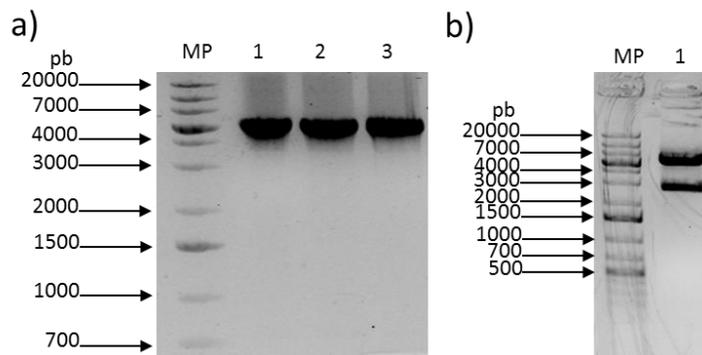


Figura 31. Etapas de amplificación y análisis de MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac en pENTR. A) Amplificación de MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac por PCR en gradiente de temperatura a 1) 55°C, 2) 56°C y 3) 57°C, oligonucleótidos: MauPvSYMRKUP y T35S-SacI, amplicón de ~5407 pb. B) Digestión enzimática de pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35SsacCol1 (carril 1) con MauBI y SacI, productos esperados: ~5425 pb, correspondiente al inserto MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac y de ~2580 pb, correspondientes al vector pENTR.

- 5) Finalmente los vectores pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac y pK2GW7-LifeAct-Turquoise2 se digirieron con las enzimas MauBI y SacI y el producto de ~5425 pb correspondiente a MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac y el producto de ~8926 pb correspondiente al vector pK2GW7-LifeAct-Turquoise2 (Fig. 32 a) se ligaron

utilizando el kit de ligación Rapid DNA Ligation de Thermo Scientific, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, para generar la construcción pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2, mediante transformación en *E. coli* DH5 α . Mediante PCR en colonia se seleccionaron 4 colonias positivas (dato no mostrado), y se confirmó su identidad por PCR usando diferentes juegos de oligonucleótidos (Fig. 32 b), por digestión enzimática con MauBI-SacI (Fig. 32 c), y MauBI-SmaI (Fig. 32 c) y por secuenciación (Fig. 33).

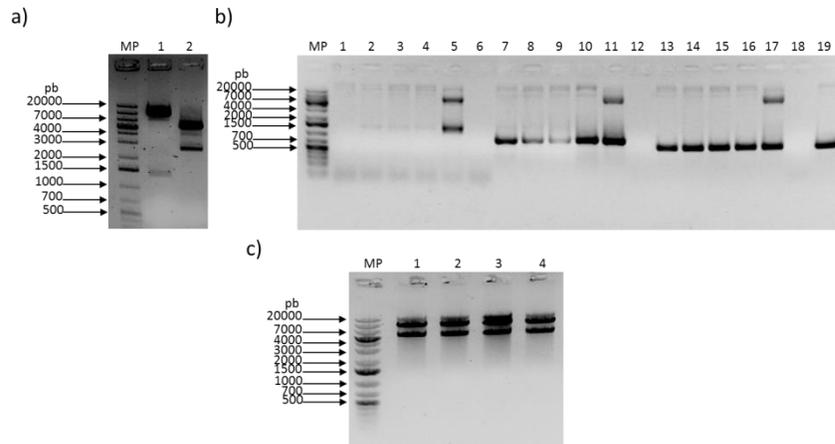


Figura 32. Etapas de clonación y análisis de la construcción pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2. A) Digestión enzimática de los vectores: carril 1) pK2GW7-LifeAct-Turquoise2 (productos esperados, ~8926 pb correspondiente al vector pK2GW7-LifeAct-Turquoise2 y ~1367 pb correspondientes al cassette de Kam) y carril 2) pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac (productos esperados ~5425 pb, correspondiente al inserto MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac y de ~2580 pb, correspondientes al vector pENTR) con las enzimas MauBI-SacI. B) Análisis por PCR de las clonas pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2, usando los siguientes juegos de oligonucleótidos: carriles 1-6 MaupPvSYMRKH5 y GW3RLK, amplicón de ~1460 pb, carriles 7-12 RSGFP3 y RL3-4, amplicón de ~871 pb, carriles 13-18 RL3-3 y RL7-3, amplicón de ~694 pb. Carriles 1, 7 y 13 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-14, carriles 2, 8 y 14 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-15, carriles 3, 9 y 15 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-16, carriles 4, 10 y 16 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-17, carriles 5, 11 y 17 control negativo sin templado y carriles 6, 12 y 18 control positivo clona pENTR-MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac. C) Digestión enzimática usando las enzimas MauBI-SacI (producto esperado ~5425 pb, correspondiente al inserto MaupPvSYMRK::PvSYMRKSmaGFPTer35Ssac y 8926 pb correspondiente al vector pK2GW7-LifeAct-Turquoise2). Carril 1 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-14, carril 2 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-15, carril 3 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-16 y carril 4 clona pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2-17.

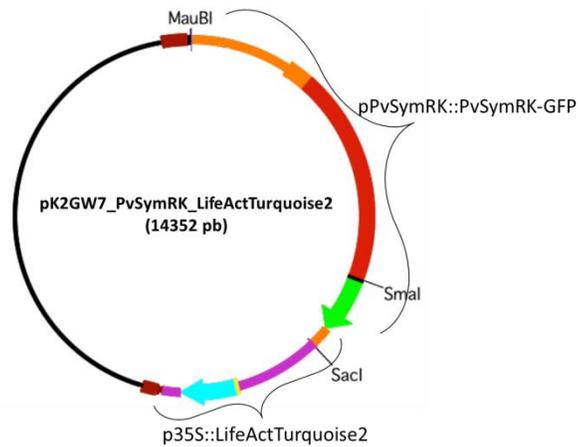


Figura 33. Representación *in silico* de la construcción pK2GW7-PvSYMRK-LifeAct-mTurquoise2. La secuencia correspondiente a pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP se confirmó completamente por secuenciación.

ANEXO 2

11.2 Análisis de pelos radicales de frijol incubados con FM4@64.

Una de las estrategias inicialmente planteadas en este trabajo para evaluar la endocitosis de PvSYMRK fue explorar la posible co-localización del marcador fluorescente de endocitosis FM4@64 y la quimera PvSYMRK-EGFP. El marcador FM4@64 es una sonda lipofílica ampliamente usada para marcar la membrana celular, debido a que se intercala en los lípidos de la cara externa de la bicapa lipídica, y en este ambiente hidrofóbico es fluorescente. Minutos después, la señal fluorescente de FM4@64 se internaliza y distribuye en el citoplasma con un patrón punteado, indicativo de un evento de endocitosis. Las condiciones de incubación y visualización de FM4@64 en pelos radicales de frijol se han estandarizado en el grupo del Dr. Luis Cárdenas Torres, colaborador de nuestro equipo de investigación. De manera general, las raíces se montan sobre cajas Petri desechables modificadas (en el centro se recorta un rectángulo y el plástico se reemplaza por un cubreobjetos) para visualizar los pelos radicales por microscopía *in vivo*. Se agregó FM4@64 (6.6 ng/μl) en la zona de la raíz que presenta pelos radicales de frijol de 48 hpg, montados en medio Fähræus líquido, y se observó en el microscopio invertido de fluorescencia (epifluorescencia o confocal) utilizando los filtros adecuados. Se capturaron imágenes con intervalos de 10 s. La Fig. 34, presenta algunas imágenes representativas. Se observó incorporación de FM4@64 en la membrana plasmática de un pelo radical a los 5 min *post*-incubación (Fig. 34 a,); a los 10 min (Fig. 34 b), se detectó fluorescencia con un discreto patrón punteado en el citoplasma del pelo radical, indicativo de internalización de FM4@64. A tiempos más avanzados (20 y 30 min) se observó una mayor acumulación de FM4@64 en la zona intracelular apical del pelo radical, potencialmente asociado a la alta densidad de vesículas endocíticas/exocíticas en el ápice del pelo radical (Fig. 34 c y d). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con ayuda del software Methamorph, el cual permite medir la intensidad de fluorescencia de una región seleccionada y así poder detectar cambios en función del tiempo. En el caso de la cinética ilustrada en la Fig. 35, se seleccionó la región apical del pelo radical (círculo verde en Fig. 34 a) y se cuantificó el nivel o intensidad de fluorescencia en imágenes capturadas a lo largo de aproximadamente 40 min. La Fig. 35 incluye imágenes representativas que ilustran la cinética de internalización del FM4@64.

Por otro lado, y dado que es imperativo demostrar que la señal fluorescente inicial está asociada a la membrana plasmática del pelo radical, se realizó un ensayo de plasmólisis suave en pelos radicales incubados con FM4@64. A los 5 min de incubación con FM4@64, se agregó sacarosa 40 mM y se procedió a registrar imágenes de microscopía en campo claro y epifluorescencia. Se observó que tanto la membrana plasmática como la señal de fluorescencia se retraen, mientras que la pared celular queda intacta (Fig. 36), indicativo de que FM4@64 se incorpora a membrana.

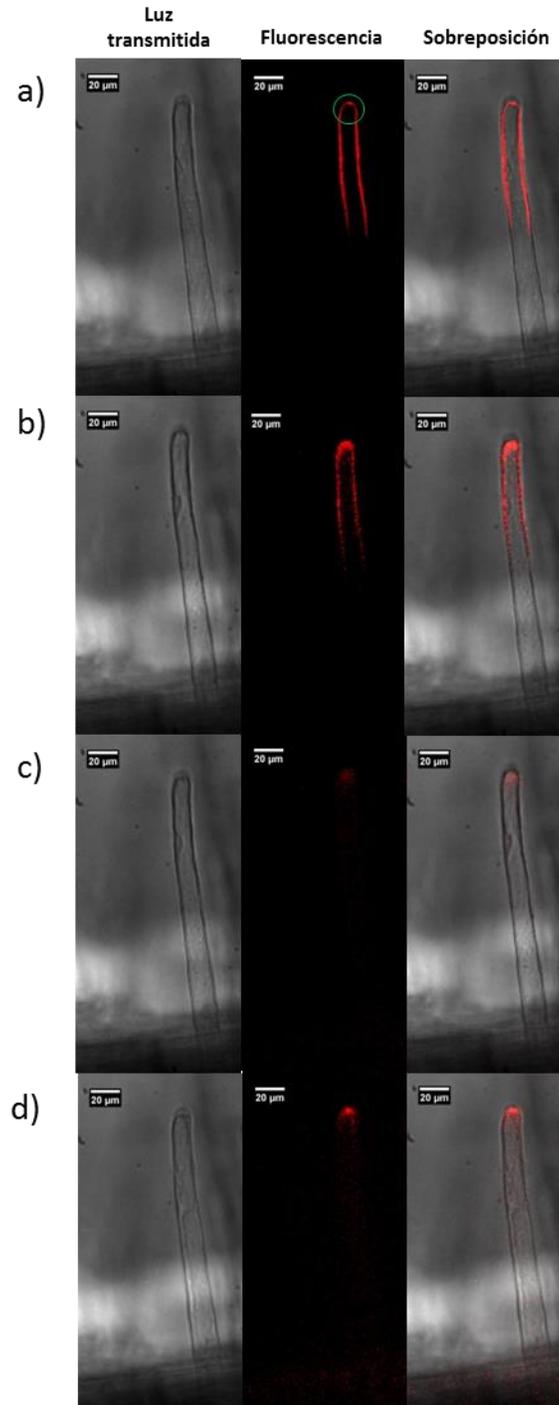


Figura 34. Visualización de pelos radicales de frijol incubados con FM4@64. Los pelos radicales de frijol de 48 hpg se incubaron con 6.6 ng/ μ l de FM4@64 y se observaron al microscopio de epifluorescencia a diferentes tiempos *post*-incubación: a) 5min; b) 10 min; c) 20 min y d) 30 min. La escala representa 20 μ m. El círculo verde representa la zona que se usó para cuantificar los niveles de fluorescencia, los valores se ilustran en la Fig. 35.

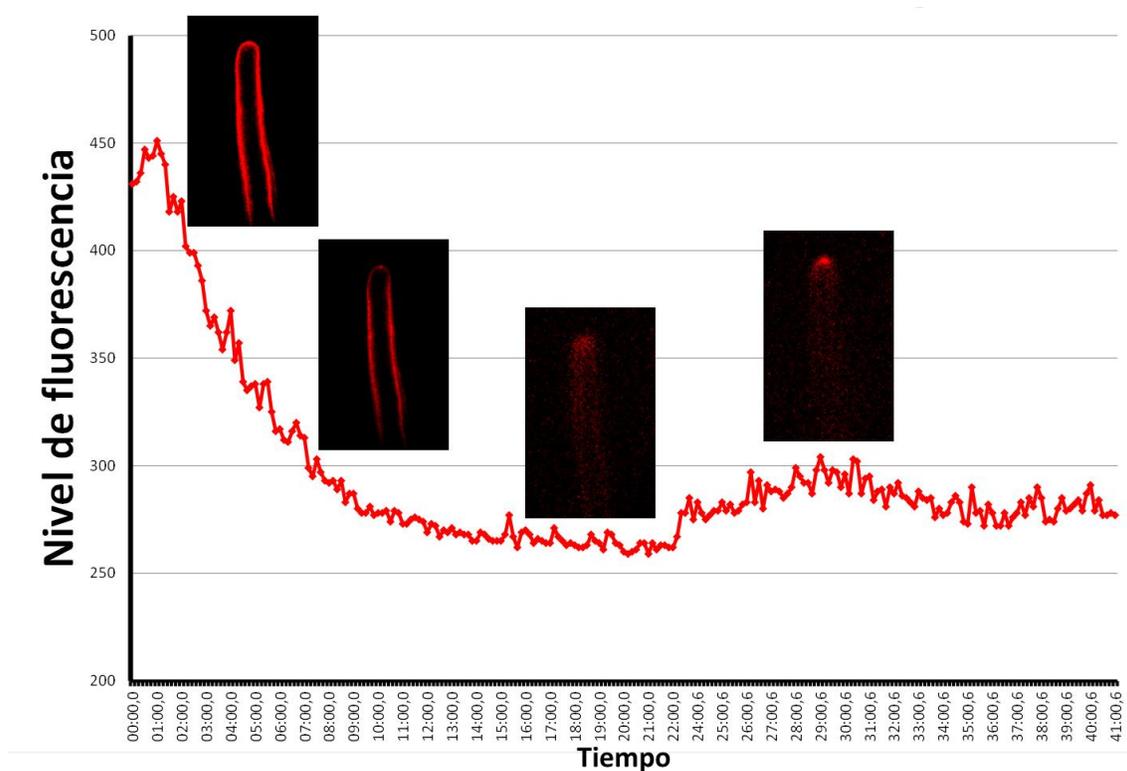


Figura 35. Cinética de internalización de FM4@64. Los pelos radicales de frijol de 48 hpg fueron incubados con FM4@64 6.6 ng/ μ l y visualizados por microscopía de epifluorescencia *in vivo*. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Metamorph, para cuantificar y graficar el nivel de fluorescencia de la región apical del pelo radical marcado con FM4@64 durante aproximadamente 40 min. Se incluyen imágenes representativas de 5, 10, 20 y 30 min *post*-incubación. Las imágenes fueron editadas con el programa ImageJ.

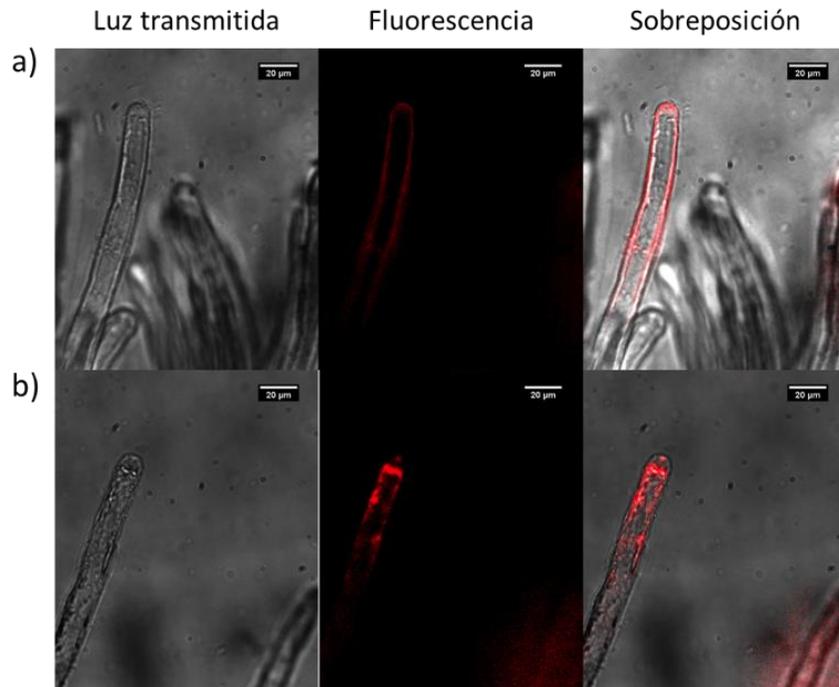


Figura 36. Plasmólisis suave en pelos radicales marcados con FM4@64. a) Pelos radicales de frijol 5 min después de la incubación con FM4@64; b) pelos radicales de frijol marcados con FM4@64 e incubados con solución de sacarosa 40 mM (5 min). La escala representa 20 µm.

11.2.1 Efecto de inhibidores de tráfico vesicular sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol.

Uno de los objetivos de este proyecto es analizar el efecto de diferentes inhibidores del tráfico vesicular como Brefeldina A (BFA), Ikarugamicina (IKA), Tirfostina A23 (Tyr23), entre otros, sobre la distribución de PvSYMRK-GFP en pelos radicales incubados con factores Nod o *R. etli* CE3/p604. Un paso previo es determinar la concentración mínima necesaria de cada inhibidor para bloquear el tráfico vesicular (endocitosis, medida como la internalización de FM4@64), y que además permita que el pelo radical siga vivo. Los pelos radicales de plántulas de 48 hpg se pre-incubaron con diferentes concentraciones de BFA (20, 50 y 100 µM) o IKA (5 y 10 µM) durante 30 min, posteriormente se agregó FM4@64 (6.6 ng/µl) y se procedió a capturar imágenes cada 10 s durante 30 min. Cada imagen fue procesada utilizando los softwares Metamorph e ImageJ. Las Fig. 45-48 presentan resultados representativos del efecto de estos inhibidores sobre la internalización de FM4@64.

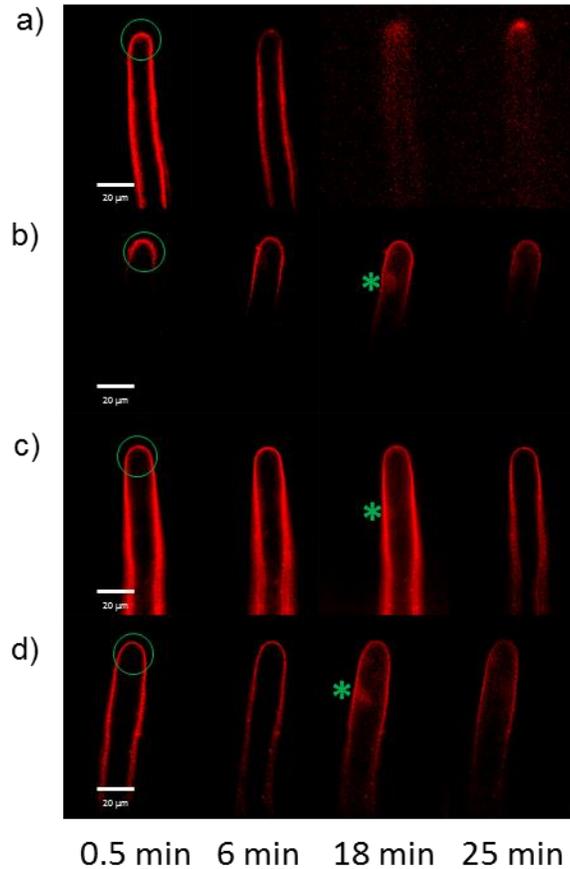


Figura 37. Imágenes representativas del efecto de BFA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol de 48 hpg. Los pelos radicales en crecimiento fueron pre-incubados con a) 0, b) 20, c) 50 o d) 100 μ M de BFA durante 30 min, después se agregó el marcador FM4@-64 (6.6 ng/ μ l) y la cinética de internalización se registró por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 30 min y captura de imágenes cada 10 s. En los pelos radicales control (a), la fluorescencia en membrana plasmática disminuye (a, 6 min) hasta ser indetectable (a, 18 min) y se internaliza con un patrón intracelular punteado, inicialmente homogéneo (a, 18 min), pero tiende a acumularse en la zona apical del pelo radical (a, 25 min). En pelos radicales pre-incubados con BFA (b-d) hay una disminución en la internalización de FM4@64 y el patrón punteado de la fluorescencia intracelular no es homogéneo, la señal fluorescente se acumula con un patrón similar a estructuras subcelulares conocidas como compartimentos-BFA (b-d, 18 min, marcados con asteriscos verdes). Los círculos verdes corresponden a la zona que se usó para cuantificar los niveles de fluorescencia en cada experimento en toda la secuencia de imágenes, los valores obtenidos se grafican en la Fig. 38.

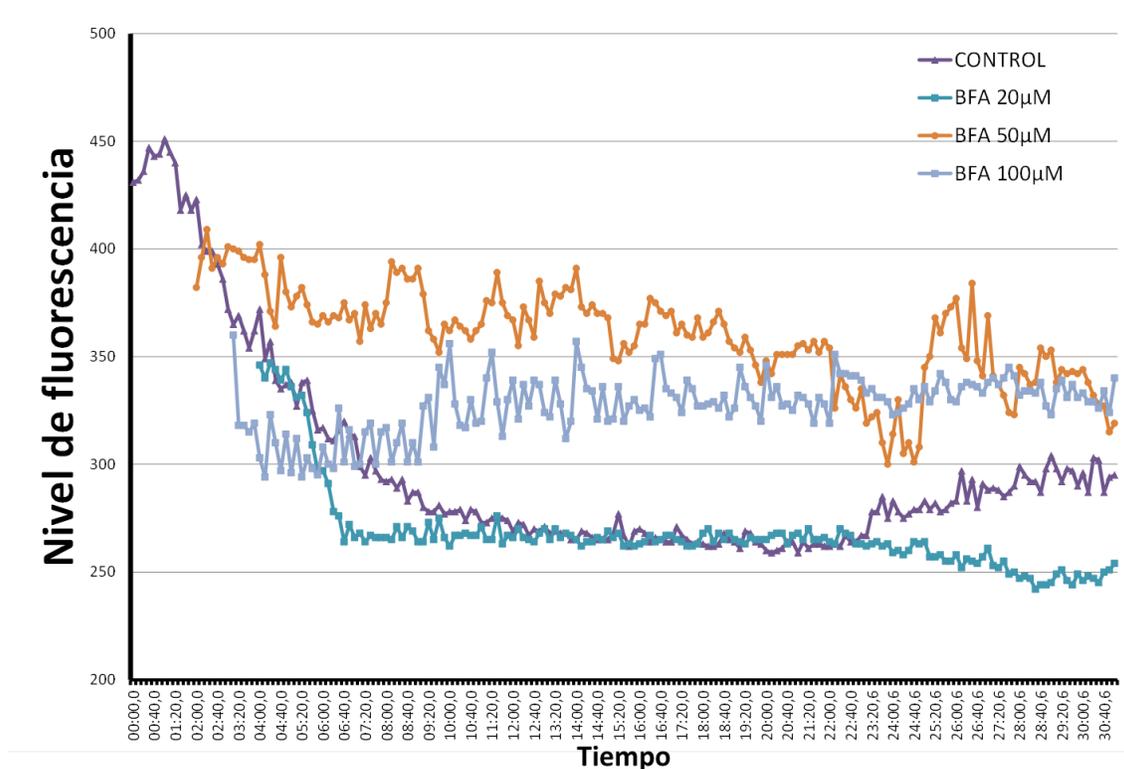


Figura 38. Gráfica representativa del efecto de BFA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol. Pelos radicales en crecimiento fueron pre-incubados con 0, 20, 50 o 100 μM de BFA durante 30 min, después se agregó el marcador FM4-64 (6.6 $\text{ng}/\mu\text{l}$). La cinética de internalización en pelos radicales se registró por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 30 min y captura de imágenes cada 10 s. Se grafican los datos de fluorescencia de la región apical de un pelo radical representativo de cada condición (área delimitada por un círculo verde en Fig. 37). El procesamiento y análisis de nivel de fluorescencia se determinó con el software Metamorph.

En los pelos radicales pre-incubados con 20-100 μM de BFA, la mayoría de la señal fluorescente permaneció en la membrana plasmática (Fig. 37 b-d). A los 18 min se observó una disminución en la internalización de FM4@64, la señal fluorescente intracelular no presentó el patrón punteado homogéneo observado en pelos radicales control (comparar Fig. 37 a-d, 18 min), sino que la fluorescencia tiende a acumularse en estructuras similares a los compartimentos de BFA. La Fig. 38 ilustra la cuantificación de la fluorescencia de FM4@64 en el ápice de los pelos radicales pre-incubados con BFA reportados en la Fig. 37 (representada por el área delimitada por un círculo verde). La gráfica muestra que la fluorescencia asociada a la membrana plasmática apical de pelos radicales pre-incubados con BFA 50-100 μM es mayor que los niveles en la membrana plasmática de pelos pre-incubados con BFA a concentraciones menores, lo que sugiere una mayor inhibición de la internalización de FM4@64, es decir, la inhibición con BFA es dosis-dependiente. En su conjunto, estos resultados confirman el potencial de BFA como herramienta para estudiar la endocitosis en pelos radicales de frijol.

Con respecto a los pelos radicales pre-incubados con el inhibidor 5 μM de IKA no mostraron un efecto significativo sobre la internalización de FM4@64, los niveles de

fluorescencia disminuyeron progresivamente de manera similar al control (Figs. 39 b y 40), lo cual indica que esta concentración no es suficiente para causar un efecto sobre el tráfico vesicular del pelo radical, por otra parte, 10 μ M de IKA, provocó un retraso en la internalización de FM4@64 (Figs. 39 c y 40). La Fig. 40 muestra la cuantificación de la fluorescencia de FM4@64 en el ápice de los pelos radicales pre-incubados con IKA reportados en la Fig. 39 (área delimitada por un círculo verde). En la gráfica se muestra que la fluorescencia asociada a la membrana plasmática en el ápice de pelos radicales pre-incubados con IKA 10 μ M es mayor que los niveles en la membrana plasmática de pelos pre-incubados con IKA a 5 μ M y del control, sugiriendo una mayor inhibición de la internalización de FM4@64, del mismo modo que BFA 50-100 μ M. Estos resultados confirman que IKA al igual que BFA son herramientas útiles para estudiar la endocitosis en pelos radicales de frijol.

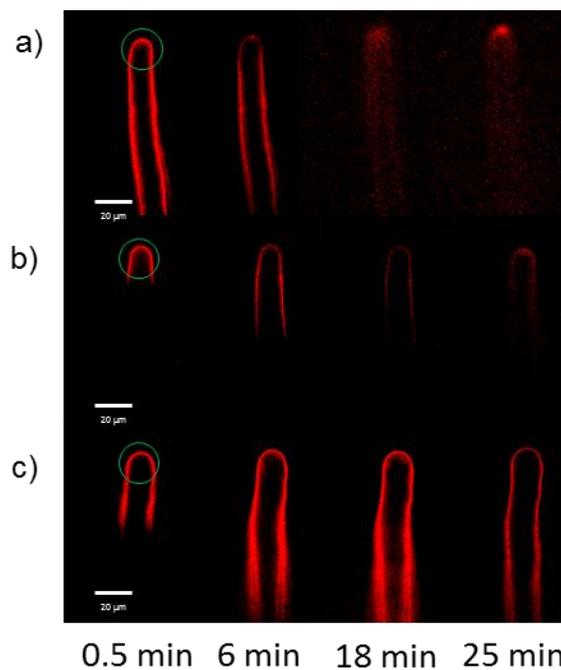


Figura 39. Imágenes representativas del efecto de IKA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol de 48 hpg. Los pelos radicales en crecimiento fueron pre-incubados con a) 0, b) 5 o c) 10 μ M de IKA durante 30 min, después se agregó el marcador FM4@-64 (6.6 ng/ μ l) y la cinética de internalización se registró por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 30 min y captura de imágenes cada 10 s. En los pelos radicales control (a), la fluorescencia en membrana plasmática disminuye (a, 6 min) hasta ser indetectable (a, 18 min) y se internaliza con un patrón intracelular punteado, inicialmente homogéneo (a, 18 min), pero tiende a acumularse en la zona apical del pelo radical (a, 25 min). En pelos radicales pre-incubados con IKA (b-c) hay una evidente disminución en la internalización de FM4@64, solamente a 10 μ M de IKA. Los círculos verdes corresponden a la zona que se usó para cuantificar los niveles de fluorescencia en cada experimento en toda la secuencia de imágenes, los valores obtenidos se grafican en la Fig. 40.

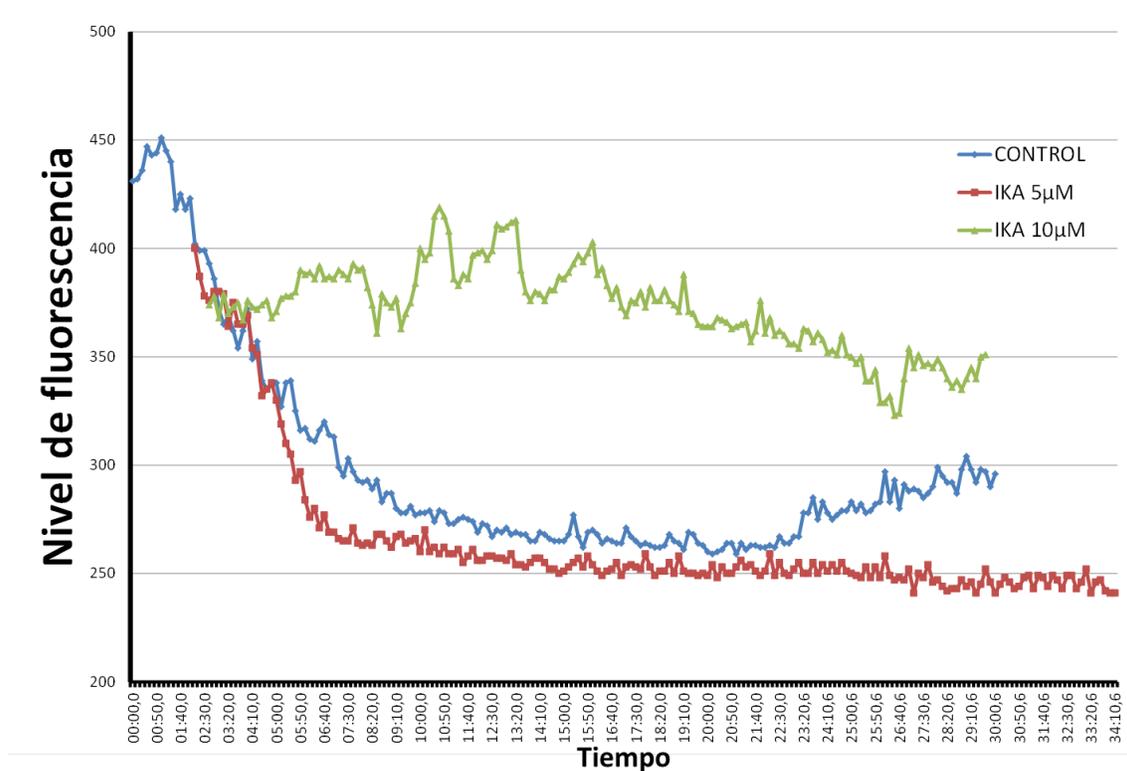


Figura 40. Gráfica representativa del efecto de IKA sobre la internalización de FM4@64 en pelos radicales de frijol. Pelos radicales en crecimiento fueron pre-incubados con 0, 5 o 10 μM de IKA durante 30 min, después se agregó el marcador FM4-64 (6.6 $\text{ng}/\mu\text{l}$). La cinética de internalización en pelos radicales se registró por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 30 min y captura de imágenes cada 10 s. Se grafican los datos de fluorescencia de la región apical de un pelo radical representativo de cada condición (área delimitada por un círculo verde en Fig. 39). El procesamiento y análisis de nivel de fluorescencia se determinó con el software Metamorph.

ENDOCITOSIS EN PLANTAS (PARTE I): INDUCIDA POR FACTORES ABIÓTICOS, BIÓTICOS Y HORMONAS*

Raúl Dávila-Delgado, María Fernanda Gómez-Méndez,
Rosario Vera-Estrella, Rosana Sánchez-López

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa,
Cuernavaca, Morelos 62210, México. Correo E: rosana@ibt.unam.mx

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran expuestos a una diversidad de estímulos como factores bióticos, abióticos y a la regulación hormonal propia de la planta. En buena medida estos estímulos al ser percibidos por receptores membranales, desencadenan la activación de vías de señalización y, por ende, la regulación de varios mecanismos bioquímicos y celulares. La endocitosis de proteínas membranales es una de las etapas de regulación en diversos mecanismos de control que las células han desarrollado para atenuar, modular o inhibir las respuestas celulares. La presente revisión recapitula información sobre los receptores y proteínas de membrana mejor caracterizados en células vegetales en el contexto de la endocitosis en respuesta a factores bióticos, abióticos y hormonas.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that are exposed to a variety of stimuli, such as biotic, abiotic factors, and hormonal regulation. These stimuli are perceived by membrane receptor, which triggers the activation of signaling pathways and, therefore, the regulation of biochemical and cellular mechanisms. The endocytosis of membrane proteins is one of the regulatory key steps in various control mechanisms that cells have developed to attenuate, modulate or inhibit cellular responses. The present review recapitulates information on the best characterized receptors and membrane proteins in plant cells in the context of endocytosis in response to biotic, abiotic and hormone factors.

PALABRAS

CLAVE:

Endocitosis,
bacterias,
plantas,
factores
bióticos,
factores
abióticos.

KEY WORDS:

Endocytosis,
bacteria,
plants,
biotic factors,
abiotic factors.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es un proceso esencial y altamente regulado en todas las células eucariotas, por el cual las células internalizan material, ya sean compuestos extracelulares o componentes de la membrana plasmática (MP) que son reclutados al sitio de endocitosis. En ese punto se promueve la invaginación de la MP hasta formar una estructura esférica que se desprende (escinde) y forma una vesícula endocítica en el citoplasma. Las principales funciones de la endocitosis en la célula son la adquisición de nutrientes, la regulación de la composición de la MP (lípidos y proteínas), la inter-

nalización de complejos (p. ej. receptor-ligando), la regulación de la transducción de señales, entre otras (1). Existen diferentes mecanismos que llevan a la endocitosis, entre los que se encuentran la endocitosis mediada por clatrina (CME, siglas en inglés de "*clathrin mediated endocytosis*"), la endocitosis mediada por caveolina, la endocitosis independiente de dinamina, clatrina y caveolina, la macropinocitosis y la fagocitosis, entre otros (2). De todos estos tipos, la CME es la principal vía endocítica que apoya las funciones básicas de las células, y a la fecha la mejor caracterizada; además es la vía por la cual la mayoría de los receptores de membrana son endocitados, por tal motivo

*Recibido: 23 de agosto de 2018 Aceptado: 4 de diciembre de 2018

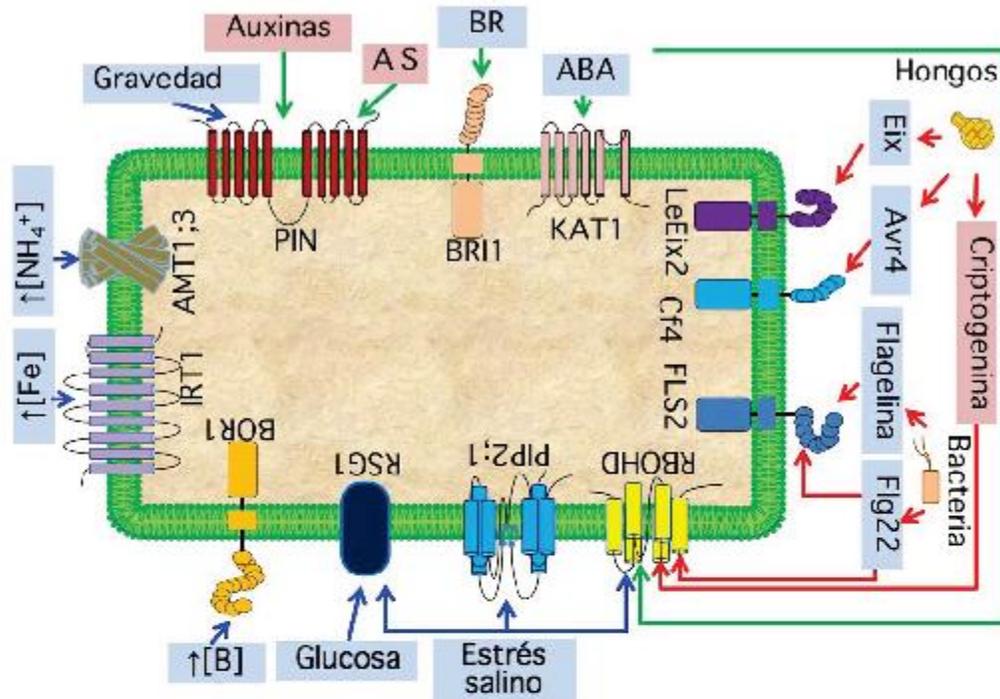


Figura 2. Factores bióticos, abióticos y hormonas que regulan la endocitosis de receptores en plantas. Hongos y bacterias actúan como factores bióticos (líneas y flechas rojas) produciendo moléculas como Eix, Avr4 y flagelina (o el péptido flg22), que inducen la endocitosis de los receptores LeEix2, Cf4 y FLS2/RBOHD, respectivamente, mientras que la criptogenina inhibe la endocitosis de RBOHD. Los factores abióticos (líneas y flechas azules), como el estrés salino, inducen la endocitosis de RBOHD, PIP2,1 y de RSG1, en este último también la glucosa actúa como inductor endocítico. El boro, el hierro y el amonio inducen la endocitosis de BOR1, IRT1 y AMT1,3 respectivamente. Las hormonas (líneas y flechas verdes), como las auxinas y el ácido salicílico (AS), inhiben la endocitosis de PIN, mientras que la gravedad la induce. Finalmente los brassinosteroides (BR) inducen la endocitosis de BRI1 mientras que la endocitosis de KAT1 y RBOHD es inducida por el ácido abscísico (ABA).

mediante una batería de proteínas, entre las que se encuentran dinaminas, profilinas y el complejo ARP2/3 (1, 2, 3). Una vez liberada la vesícula, se desensambla la cubierta de clatrina y la vesícula se fusiona al endosoma temprano (en el caso de células animales), o a la red *trans* del Golgi (TGN, siglas en inglés de "trans Golgi Network") en el caso de células vegetales, en las cuales TGN también lleva a cabo las funciones de endosoma temprano. A partir de aquí, las moléculas cargo son segregadas según sea su destino: reciclarse a la MP o dirigirse hacia su degradación vía endosomas tardíos y lisosoma (en células animales) o cuerpos multivesiculares (MVB, siglas en inglés de "multivesicular bodies") y vacuola (en plantas y levadura) (2). El estudio

de la endocitosis en plantas ha utilizado diferentes estrategias, como por ejemplo el uso de mutantes, de ingeniería genética y de compuestos que bloquean el proceso endocítico.

Endocitosis inducida por factores bióticos

Las células vegetales interactúan y responden de formas muy sofisticadas al estrés biótico (interacción con bacterias patogénicas y simbióticas y hongos patogénicos y no patogénicos). Frente a estos estímulos, muchas proteínas de membrana de la planta se endocitan (Fig. 2) para activar o regular los mecanismos de respuesta de la planta, ante estos diversos estreses, p. ej.: la regulación

de los componentes de la membrana y la pared celular, la producción de compuestos antimicrobianos, la secreción de proteínas de defensa, etc. En el caso particular de la relación simbiótica entre leguminosas-rhizobia, la vía de señalización culmina, en la reprogramación de la célula hospedera, el pelo radical, para permitir la invasión de la raíz con la bacteria simbiótica.

Como parte de los elementos de respuesta, las plantas han desarrollado mecanismos de detección de patógenos y activación de mecanismos de defensa. Uno de los mecanismos de detección de patógenos mejor caracterizado es el inducido por flagelina (principal proteína componente del flagelo) de bacterias patógenas en plantas (p. ej. *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, entre otras). En *Arabidopsis thaliana*, la flagelina es reconocida por la proteína de MP FLS2 (siglas en inglés de "flagellin sensitive2", Fig. 2) (5, 6), un receptor transmembranal tipo cinasa con dominios repetidos ricos en leucina (RLK-LRR). La interacción de este receptor con flagelina desencadena las respuestas inmunes innatas de la planta; de hecho el péptido de 22 residuos, conocido como flg22 (Fig. 2) y cuya secuencia deriva del extremo N-terminal de la flagelina de *P. aeruginosa* (4), induce una respuesta de defensa similar al ser percibido por FLS2. Brevemente, después de percibir al ligando (flagelina o flg22), FLS2 recluta al receptor BAK1 (siglas en inglés de "BRI1-associated kinase 1", donde BRI es el receptor de brasinoesteroides, Fig. 2; ver abajo), otra proteína transmembranal tipo RLK-LRR, con la que forma un dímero en MP (5). Esto promueve la activación de un complejo proteico, que inicia la respuesta de defensa de la planta, pero cuya composición no ha sido completamente caracterizada. La respuesta consiste en: la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fosforilación de proteínas, la activación de cascadas de señalización por MAP cinasas, y la inducción de la transcripción de genes de respuesta a patógenos (4). Posteriormente, FLS2 es ubiquitinado por las ubiquitin ligasas E3 PUB12 y PUB13 y fosforilado por BAK1, lo que conduce a la endocitosis del receptor FLS2. El análisis por microscopía de fluorescencia de raíces de *A. thaliana* que expresan FLS2-GFP reveló que la endocitosis de FLS2 ocurre solo minutos después de la incubación con el inductor flg22, y que además su endocitosis está mediada por CME. Una vez que FLS2 es endocitado, las vesículas endocíticas eventualmente se fusionan con los MVB, antes de ser transportados a la vacuola central para su degradación (5, 6). La endocitosis de FLS2 resulta ser un mecanismo que atenúa la cascada de señalización iniciada por flg22 para controlar la respuesta celular (5).

Adicionalmente se sabe que en presencia de BFA (brefeldina A, inhibidor de transporte intracelular) y ausencia del ligando, el receptor FLS2 se endocita de manera constitutiva, si bien a una menor tasa, pero no se degrada, sino que se recicla a MP (6).

Tanto el inductor flg22, como la hormona vegetal ácido abscísico y el estrés salino promueven la endocitosis de otra proteína involucrada en las interacciones planta-microorganismo, las NADPH oxidasas de plantas o también conocidas como RBOH (siglas en inglés de "Respiratory Burst Oxidase Homologues", Fig. 2) (7). Estas proteínas son una de las principales fuentes de producción de ROS durante interacciones patógenicas y no patógenicas, se sabe que particularmente RBOHD se organiza en puntos dinámicos en la MP, probablemente asociadas a secciones de la membrana que se conocen como microdominios de membrana (7). Los microdominios de membrana son fracciones de MP enriquecidas con esfingolípidos y esteroides, involucrados en el reconocimiento de diversos ligandos y en varias vías de señalización, y a través de los cuales se lleva a cabo la endocitosis independiente de clatrina (8). Algunas de las proteínas de andamiaje asociadas a la formación de microdominios, p. ej. las flotilinas y remorinas, han sido identificadas lo que sugiere que las plantas realizan endocitosis independiente de clatrina. Al analizar la endocitosis de RBOHD de *A. thaliana* en líneas mutantes deficientes en la cadena pesada de clatrina-2 o en una línea con silenciamiento (mediado por microARN) del gen de flotilina 1, se determinó que RBOHD se internaliza utilizando dos vías endocíticas, CME y una independiente de clatrina (9). Por otro lado, la incubación con criptogenina, una proteína del hongo *Phytophthora cryptogea*, activa los mecanismos de defensa en células de tabaco BY-2 que expresan RBOHD, e induce un aumento significativo en la abundancia de RBOHD en la MP y una disminución concomitante en los compartimentos internos, sugiriendo que criptogenina, inhibe la endocitosis de RBOHD y estimula su localización en la MP (10).

Otro de los mecanismos de defensa que involucra endocitosis es el activado por el potente inductor fúngico conocido como xilanasa inductora de etileno (Eix, por siglas en inglés de "Ethylene-inducing xylanase", Fig. 2), cuyas características han sido estudiadas en cultivares de tabaco (*N. tabacum*) y de tomate (*Solanum lycopersicum*) (11). Al igual que FLS2 y BAK1, los receptores de Eix, conocidos como LeEix1 y LeEix2, son del tipo RLK-LRR y tienen un dominio transmembranal. La parte intracelular, adyacente a la membrana (yuxtamembranal), de LeEix1 y LeEix2 presenta un tetrapéptido (YXXØ, donde Y es tirosina; X es cualquier aminoácido y

Ø es un aminoácido con una cadena hidrofóbica), que interactúa con la subunidad μ del complejo adaptador AP2 de la maquinaria de la CME y promueve la endocitosis (12). Uno de los mecanismos propuestos sugiere que, bajo condiciones estables, LeEix1 y BAK1 forman un heterodímero, el cual en presencia de Eix forma un complejo con LeEix2 y evita la internalización y señalización de éste (12). La relevancia celular de este posible mecanismo de regulación aún se desconoce.

Otro caso interesante es el que se presenta cuando el receptor membranar Cf4 de tomate interactúa con el efector Avr4 (del inglés "avirulence proteins4", Fig. 2) del hongo patógeno *Cladosporium fulvum*. El receptor Cf4 es endocitado como parte del mecanismo que desencadena la resistencia especie-específica de la planta contra el hongo (13).

Las asociaciones simbióticas planta-microorganismo también están mediadas por una o más interacciones ligando-receptor. Durante las etapas tempranas en la simbiosis leguminosa-rhizobia (bacterias del suelo), las bacterias liberan compuestos conocidos como factores de nodulación, los cuales son reconocidos por receptores tipo LysM, NFR1/NFR5, y la subsecuente activación del receptor tipo RLK-LRR conocido como SymRK. Estos eventos de reconocimiento y activación desencadenan una cascada de señalización que da lugar a la infección con rhizobia y la formación del nódulo. Si bien no ha sido demostrado, los receptores NFR1/NFR5 y SymRK pudieran ser blanco de endocitosis. En etapas tardías de la interacción simbiótica, las bacterias son atrapadas en los pelos radicales de las raíces y se inicia la formación de una estructura tubular, transcelular conocida como hilo de infección (HI), por el cual las bacterias ganan acceso hacia el córtex de la raíz. En paralelo, se induce la división de las células corticales formando una masa celular conocida como primordio de nódulo. Una vez que el HI alcanza este tejido, las bacterias son liberadas del HI e internalizadas a las células del primordio de nódulo, por un mecanismo endocítico tipo fagocitosis. Sin embargo, no existen reportes que analicen este proceso ni que lo ligen con algún componente de la maquinaria endocítica (14). Por otro lado, se ha reportado que las proteínas remorina y flotilina, son fundamentales para la infección por *Sinorhizobium meliloti* en la planta *Medicago truncatula* (14).

Endocitosis inducida por factores abióticos

Las proteínas membranales desempeñan funciones esenciales no solo en la protección contra patógenos e interacciones mutualistas, sino también en el desarrollo, crecimiento y nutrición de las plantas. Por ejemplo, la regulación de la homeostasis iónica en

las plantas es un proceso que permite a la planta obtener nutrientes y responder a estreses abióticos importantes como la sequía, la salinidad, el calor, el frío, la acidez y los ambientes oxidantes. En raíces de *A. thaliana*, bajo condiciones limitantes de boro, el transportador de boro (BOR1) se localiza en la MP (Fig. 2) y su actividad se regula por medio de endocitosis de reciclaje constitutivo, es decir, se recicla entre la MP y el TGN. Cuando las raíces están expuestas a una alta concentración de boro, BOR1 se ubiquitina y endocita vía CME para después ser redistribuido a la vacuola, probablemente para su degradación. De ese modo la célula controla la entrada de boro. Sin embargo, la maquinaria necesaria para la endocitosis de BOR1 aún no se ha caracterizado (15).

Del mismo modo, el transportador de hierro (IRT1), es fundamental para el desarrollo de la planta. Cuando hay bajas concentraciones de hierro en el medio, este transportador permite el transporte de otros metales como manganeso, cobalto, níquel o cadmio (16). IRT1 se localiza de manera polarizada en las membranas (Fig. 2) de las células epidermales de la raíz de *A. thaliana* y, en concentraciones elevadas de hierro y otros metales en el medio, este receptor es endocitado vía CME (16 y 17). Se propone que la endocitosis de IRT1 es un mecanismo de control *post*-traduccional que permite evitar la entrada excesiva de hierro a la célula; por otro lado, en condiciones de ausencia de hierro y otros metales IRT1 es poco abundante en la MP y presenta endocitosis de reciclaje constitutivo, lo que sugiere que este puede ser un mecanismo de protección para reducir la absorción de algunos metales tóxicos a la célula (17).

Otro de los ejemplos de proteínas cuya endocitosis es inducida por factores abióticos es la acuaporina PIP2;1 de *A. thaliana*. PIP2;1 (Fig. 2) es una proteína integral de membrana que facilita el transporte de agua a través de la MP (21). Análisis por microscopía tipo TIRF (siglas en inglés de "Total Internal Reflection Fluorescence") mostró que PIP2;1 se encuentra distribuida heterogéneamente en la MP. En respuesta a estrés salino, PIP2;1 es endocitada por dos vías endocíticas distintas, regulando así su abundancia en MP: una vía dependiente de clatrina (sensible a tirfostina A23) y una ruta asociada a microdominios de membrana (sensibles a β -ciclodextrina) (21). La proteína RGS1 (un posible receptor de D-glucosa; del inglés "Regulator of G protein signaling1"; Fig. 2) de *A. thaliana*, también es endocitada en respuesta a estrés salino y glucosa. Esta proteína es capaz de interactuar con el complejo de proteínas G heterotriméricas, las cuales han sido postuladas como mediadores importantes frente al estrés salino y sequía (22), sin embargo,

su caracterización aún continúa en proceso.

El amonio es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que su transporte está finamente regulado por las células vegetales. Uno de los mecanismos que utilizan las células de la raíz para regular el transporte de amonio, es a través de la endocitosis de los transportadores de amonio. En *A. thaliana*, se han caracterizado los transportadores AMT1;1 y AMT1;3 (Fig. 2), los cuales se encuentran presentes en la MP de las células de las raíces, y en ausencia de amonio o en concentraciones suficientes de amonio, los transportadores oscilan dinámicamente en la MP, por medio de reciclaje constitutivo. Sin embargo, cuando hay altas concentraciones de amonio (que se sabe que es tóxico para las células) en el medio, AMT1;3 se acumula en regiones particulares de la MP, y luego se endocita. Gracias al análisis de AMT1;3 en fondos mutantes en la cadena pesada de clatrina (mutante *chc2*), se sabe que la endocitosis ocurre por CME; evidencia reportada recientemente sugiere que también participa la vía endocítica asociada a microdominios. La endocitosis de AMT1;3 proporciona un mecanismo eficaz por el cual las células vegetales pueden evitar la acumulación de niveles tóxicos de amonio y de este modo proteger a la célula (23).

Endocitosis inducida por hormonas

Las hormonas vegetales son importantes reguladores del crecimiento en las plantas, entre sus funciones más importantes destacan: la regulación del metabolismo basal, la estimulación de la respuesta de defensa de las plantas, el crecimiento, y mejorar las condiciones bajo cualquier tipo de estrés (24). Existen muchas moléculas que funcionan como hormonas vegetales, pero las más caracterizadas son las auxinas, las citocininas, los brasinosteroides, las giberelinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico y el ácido salicílico (24).

Los transportadores de auxinas PIN (del inglés "*Pin-Formed*", Fig. 2) permiten, determinan, y dan la dirección de la salida de las auxinas entre las células vegetales. Las auxinas son hormonas vegetales que participan en prácticamente todos los procesos de desarrollo de las plantas y, a nivel celular, intervienen en la división, elongación y diferenciación celular (18). En *A. thaliana* existen 8 miembros de la familia PIN, de los cuales 5 se encuentran en MP y determinan el eflujo de auxinas. Por otro lado, las proteínas AUX1/LAX, pertenecientes a una subfamilia de permeasas, actúan como simportadores de auxinas, permitiendo la entrada de auxinas a la célula. Los PIN presentan una localización membranal polarizada, y la gravedad es un factor importante para ubicar y reubicar a los PIN dentro de la misma

célula, p.ej., cuando las raíces de la planta (que normalmente crecen verticalmente) son colocadas en una posición horizontal, tienden a reorientarse verticalmente en respuesta a la gravedad, esto debido a que se redirige el flujo de auxinas en el ápice de la planta (19). El modelo propuesto es que los PIN, particularmente PIN2 y PIN3, son endocitados vía CME y reubicados hacia el nuevo sitio polarizado de la célula (denominándose transcitosis) (20), lo cual redirige el flujo de auxinas.

Las auxinas inhiben la CME de los transportadores PIN1, PIN2 y el marcador membranal FM4-64 (25), sin embargo, no afecta la internalización de la acuaporina PIP2;1. Parece ser que el mecanismo de inhibición endocítica causada por las auxinas, necesita de la presencia de esteroides de membrana y de la activación de una GTPasa pequeña, la ROP6 (26). Además, se ha reportado que las auxinas disminuyen la asociación de CLC a la MP (24), contribuyendo de este modo a inhibir la endocitosis. Un efecto similar ocurre cuando la raíz de *A. thaliana* se incuba con ácido salicílico, una hormona que se activa en respuestas a patógenos. Al igual que las auxinas, el ácido salicílico tiene un efecto negativo en la endocitosis de PIN1, PIN2, PIP2;1 y FM4-64. Un dato interesante, el ácido salicílico no afecta la endocitosis de FLS2. El mecanismo por el cual el ácido salicílico inhibe la endocitosis no está completamente esclarecido, pero al igual que las auxinas parece afectar la asociación de clatrina con la MP (27). Las citocininas también están involucradas en la distribución polarizada de PIN1 (28). Si bien la incubación de raíces en presencia de citocininas exógenas no afecta la endocitosis de PIN1, sí disminuye su reciclaje entre endosomas y la MP, favoreciendo la ruta de degradación hacia la vacuola (29). Este efecto parece ser específico para PIN1, ya que otros transportadores como PIN2 o PIN7 no se ven afectados.

Los brasinosteroides (BR) son otras de las hormonas vegetales involucradas en la endocitosis de receptores. Los BR son reconocidos por el receptor de los brasinosteroides BRI1 (Fig. 2), que se localiza en la MP y en los endosomas de las células de la raíz de *A. thaliana* (30). En ausencia de BR, BRI1 presenta endocitosis constitutiva. Esto ha sido demostrado gracias a experimentos realizados en raíces que expresan BRI1-GFP e incubadas con BFA; en presencia de BR, BRI1 se internaliza mediante CME (30). La endocitosis de BRI1 se lleva a cabo principalmente para atenuar la señalización inducida por los BR, pues el bloqueo de la endocitosis de BRI1 da como resultado respuestas a BR exacerbadas (30).

Finalmente, el ácido abscísico (ABA), un regulador del transporte de iones y la transpiración en las

TABLA 1

Proteínas de membrana endocitadas por factores bióticos, abióticos u hormonales en células vegetales.

Proteína de membrana	Factor biótico	Factor abiótico	Hormona	Referencias
FLS2	Flagelina, flg22	-	-	5, 6
RBOHD	Flg22, Criptogenina*	Estrés salino	Ácido abscísico	7, 8 , 9 y 10
LeEix2	Eix	-	-	11 y 12
Cf4	Avr4	-	-	13
BOR1	-	Altas concentraciones boro	-	15
IRT1	-	Altas concentraciones de hierro	-	16 y 17
PIP2;1	-	Estrés salino	-	21
RGS1	-	Estrés salino, glucosa	-	22
AMT1;3	-	Altas concentraciones de amonio	-	23
PIN	-	Gravedad	Auxinas*, ácido salicílico*	19 y 20
BRI1	-	-	Brasinosteroides	30
KAT1	-	-	Ácido abscísico	31

* Inhiben la endocitosis

plantas bajo estrés hídrico, promueve la endocitosis del canal de potasio KAT1 (Fig. 2) en las células de la epidermis de *A. thaliana*. La endocitosis permite que KAT1 se acumule en el endosoma, para posteriormente ser reciclado, esto con el objetivo de modular la actividad del canal (31) (Tabla 1).

Conclusiones

Si bien durante mucho tiempo se consideró que las células vegetales no tenían actividad endocítica, una vez que se demostró lo contrario, el estudio de la endocitosis en estas células ha progresado en relativamente en poco tiempo. Hoy en día, se pueden distinguir al menos dos vías endocíticas independientes en plantas, la CME y la endocitosis mediada por microdominios membranales (con proteínas marcadoras como flotilinas y remorinas). En ambos casos la maquinaria celular que se encarga de iniciar, regular y concluir el proceso, continúa siendo caracterizada a pasos agigantados. No obstante, y dado que en las células animales existen diferentes vías endocíticas, se propone que pueden existir otras vías endocíticas en las células vegeta-

les, algunas de ellas probablemente reguladas para que sólo se ejecuten en una célula o en un tejido en específico. Actualmente esto constituye un reto dentro de la biología vegetal.

El estudio de la función de algunas proteínas membranales ha llevado a demostrar que también en células vegetales la endocitosis es uno de los mecanismos de regulación de la transducción de señales en la respuesta a patógenos, hormonas, estrés abiótico, entre otros (Tabla 1). La endocitosis de FLS2, PIN2 y de BRI1 se ha convertido en los ejemplos clásicos de endocitosis en plantas, no sólo porque fueron de los primeros en ser estudiados, sino también porque su caracterización llevó a identificar las moléculas inductoras (ligando correspondiente). Sin duda, el número de receptores activados por inductores es mayor a lo estimado. Considerar que pueden ser endocitados en respuesta a un estímulo ofrece la posibilidad de descifrar los mecanismos de activación y regulación, y comprender la función que la endocitosis tiene en procesos celulares fundamentales como en el desarrollo y la respuesta a condiciones ambientales. 

REFERENCIAS

1. Watanabe S, Boucrot E (2017) Fast and ultrafast endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 47:64-71.
2. Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902.
3. Holstein SE (2002) Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* 3:614-620.
4. Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18:265-276.
5. Mbengue M, Bourdais G, Gervasi F, Beck M, Zhou J, Spallek T, Bartels S, Boller T, Ueda T, Kuhn H, Robatzek S (2016) Clathrin dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:11034-11039.
6. Bücherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzek S, MacLean D, Ott T, Zipfel C (2017) Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *eLife* 6:e25114.
7. Liu Y, He C (2016) Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Rep* 35:995-1007.
8. Ott T (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 40:82-88.
9. Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA, Lin J (2014) Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:1729-1745.
10. Noirot E, Der C, Lherminier J, Robert F, Moricova P, Kiêu K, Leborgne-Castel N, Simon-Plas F, Bouhidel K (2014) Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *J Exp Bot* 65:5011-5022.
11. Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A (2010) BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant J* 63:791-800.
12. Sharfman M, Bar M, Ehrlich M, Schuster S, Melech-Bonfil S, Ezer R, Sessa G, Avni A (2011) Endosomal signaling of the tomato leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant J* 68:413-423.
13. Bar M, Avni A (2009) EHD2 inhibits signaling of leucine rich repeat receptor-like proteins. *Plant Signal Behav* 4:682-684.
14. Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Rev* 11:252-263.
15. Yoshinari A, Takano J (2017) Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants. *Front Plant Sci* 8:1951
16. Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Friml J, Vert G (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:450-458.
17. Zelazny E, Vert G (2015) Regulation of Iron Uptake by IRT1: Endocytosis pulls the trigger. *Mol Plant* 8:977-979.
18. Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943-950.
19. Kleine-Vehn J, Ding Z, Jones AR, Tasaka M, Morita MT, Friml J (2010) Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22344-9.
20. Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 8:249-256.
21. Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu DT, Maurel C, Lin J (2011) Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* 23:3780-3797.
22. Colaneri AC, Tunc-Ozdemir M, Huang JP, Jones AM (2014) Growth attenuation under saline stress is mediated by the heterotrimeric G protein complex. *BMC Plant Biol* 14:129.
23. Wang Q, Zhao Y, Luo W, Li R, He Q, Fang X, Michele RD, Ast C, von Wirén N, Lin J (2013) Single-particle analysis reveals shutoff control of the Arabidopsis ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13204-13209.
24. Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd Allah EF, Hashem A (2017) Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for

- Plants to Balance Stress and Fitness. *Front Microbiol* 8:2104.
25. Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, Hayashi K, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek SY, Jones AM, Luschnig C, Aniento F, Zažímalová E, Friml J (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143:111-121.
 26. Lin D, Nagawa S, Chen J, Cao L, Chen X, Xu T, Li H, Dhonukshe P, Yamamuro C, Friml J, Scheres B, Fu Y, Yang Z (2012) A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr Biol* 22:1319-1325.
 27. Du Y, Tejos R, Beck M, Himschoot E, Li H, Robatzek S, Vanneste S, Friml J (2013) Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7946-7951.
 28. Marhav'ý P, Duclercq J, Weller B, Feraru E, Bielach A, Offringa R, Friml J, Schwechheimer C, Murphy A, Benková E (2014) Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Curr Biol* 24:1031-1037.
 29. Marhav'ý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev Cell* 21:796-804.
 30. Di Rubbo S, Irani NG, Kim SY, Xu ZY, Gadeyne A, Dejonghe W, Vanhoutte I, Persiau G, Eeckhout D, Simon S, Song K, Kleine-Vehn J, Friml J, De Jaeger G, Van Damme D, Hwang I, Russinova E (2013) The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:2986-2997.
 31. Sutter JU, Sieben C, Hartel A, Eisenach C, Thiel G, Blatt MR (2007) Abscisic acid triggers the endocytosis of the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Curr Biol* 17:1396-1402.

LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS (PARTE II): COMO ESTUDIARLA UTILIZANDO INHIBIDORES*

María Fernanda Gómez-Méndez, Raúl Dávila-Delgado, Rosana Sánchez-López, Rosario Vera-Estrella

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Correo E: rosario@ibt.unam.mx

RESUMEN

La endocitosis es un mecanismo fundamental para la fisiología de las células eucariotas. En plantas, el estudio de la endocitosis se ha desarrollado a partir de la caracterización de mutantes, el uso de técnicas bioquímicas, microscópicas y por medio del uso de agentes químicos que actúan sobre la maquinaria endocítica, típicamente inhibidores del proceso endocítico. Utilizando estas metodologías ha sido posible explorar la endocitosis en plantas, y subsecuentemente ha permitido entender la importancia de este proceso y agilizar su caracterización a nivel molecular y celular. En esta revisión se resumen los agentes químicos más utilizados para el estudio de la endocitosis en plantas, y se explica su origen, su efecto y la importancia de su uso para continuar la investigación en esta área de la biología vegetal.

ABSTRACT

Endocytosis is a fundamental mechanism for the physiology of eukaryotic cells. In plants, the study of endocytosis has been developed from the characterization of mutants, the use of biochemical, microscopic techniques and using chemical agents that act on the endocytic machinery, typically inhibitors of the endocytic process. Using these methodologies, it has been possible to explore the endocytosis in plants, and subsequently it has allowed to understand the importance of this process and to speed up its characterization at the molecular and cellular level. This review summarizes the most commonly used chemical agents for the study of endocytosis in plants, and explains their origin, their effect and the importance of their use to continue research in this area of plant biology.

PALABRAS

CLAVE:

Células vegetales, endocitosis, inhibidores endocíticos.

KEY WORDS:

Plant cells, endocytosis, endocytic inhibitors.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es el proceso por el cual las células eucariotas internalizan componentes de la membrana plasmática (MP) y/o material del espacio extracelular al citosol, a través de la invaginación de la bicapa lipídica, lo cual da lugar a una estructura tipo fosa, que posteriormente culmina en la formación de vesículas endocíticas. Estas vesículas, una vez liberadas, se fusionan con compartimentos intracelulares llamados endosomas, los cuales permiten dirigir las moléculas endocitadas o cargos hacia su degradación o reciclaje (1, 2). El proceso de endocitosis se observó por primera vez en el año

de 1866, por Metchnikoff, quien reportó la toma de material extracelular y su posterior degradación en diferentes especies de invertebrados infectados por hongos (1). A partir de este reporte y de la publicación de una gran cantidad de investigaciones, se ha logrado definir a la vía endocítica como un mecanismo molecular fundamental para mantener la homeostasis celular. Actualmente, se sabe que la endocitosis es un proceso que controla la composición de la MP, mantiene la polaridad celular, participa en la absorción de nutrientes, en la respuesta celular a toxinas y a patógenos y además funciona como una plataforma de señalización, debido a que regula la cantidad de receptores y

*Recibido: 19 de septiembre de 2018 Aceptado: 4 de diciembre de 2018

ligandos presentes en la MP, los cuales una vez que se endocitan activan cascadas de señalización (2). Mucho del conocimiento sobre la endocitosis se ha desarrollado utilizando levaduras y células animales (3). En las células animales, por ejemplo, se han reportado diferentes vías endocíticas, como la fagocitosis o aquellas dependientes e independientes de clatrina, caveolina y/o balsas lipídicas, las cuales difieren en el tamaño del material que se endocita, la maquinaria molecular implicada y la regulación necesaria para que estas vías funcionen (1, 3). El estudio de la endocitosis en plantas en un inicio era cuestionable debido a la presencia de la pared celular y a la alta presión de turgencia que mantienen estas células, lo que sugería el impedimento de la invaginación de la MP. Sin embargo, Hilmer y cols, utilizando conjugados de lectina y oro demostraron que el proceso de endocitosis sí ocurre en las células vegetales y paralelamente se demostró que la endocitosis en plantas es energéticamente posible, incluso en las células guarda que tienen altos índices de presión de turgencia (4). Durante los últimos años, se ha logrado identificar a la endocitosis en plantas como un proceso fundamental que depende del tipo celular y que responde a moléculas de señalización y a estímulos medioambientales tales como la luz, los nutrientes y el estrés biótico y abiótico (2, 5). Mucho de este conocimiento, se ha logrado gracias al uso de mutantes y compuestos químicos o agentes farmacológicos, que inciden en un punto específico durante el proceso de endocitosis (2, 5, 6). Además, la capacidad de marcar a proteínas implicadas en la endocitosis con moléculas fluorescentes ha sido importante para la visualización de la endocitosis por medio de microscopía confocal. Aunado a esto, la combinación de la microscopía confocal con los compuestos químicos que afectan el proceso endocítico, ha permitido mejorar el entendimiento de la endocitosis en plantas, en los últimos años. En esta revisión se resumen los últimos avances en el área y la importancia del uso de estos agentes para la caracterización de la endocitosis en plantas.

METODOLOGÍAS PARA ESTUDIAR LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS

Para estudiar la regulación temporal y espacial de la endocitosis en plantas, se han utilizado plantas mutadas en alguno de los genes implicados en la endocitosis (2, 5). La mayoría de estos análisis utilizaron mutantes por inserción de T-DNA, por ejemplo, las mutantes *clc-2*, *chc1* y *chc2* utilizadas para caracterizar funcionalmente las cadenas ligeras (CLC) y pesadas (CHC) de clatrina (para

mayor detalle ver "Endocitosis en plantas inducida por factores bióticos, abióticos y hormonas"). Otros ejemplos de mutantes que fueron claves para elucidar la función de algunos genes en la endocitosis son *bak1*, *epsin1*, *snx2b* y *trs1*, o las mutantes de *gnomR5* y *bor1-1* generadas por medio de etil-metano-sulfonato (2). Si bien, el uso de mutantes ha permitido conocer más acerca de la maquinaria endocítica en plantas, se ha reportado que mutaciones en genes importantes para el tráfico celular, en ocasiones producen fenotipos letales ya sea en los embriones o en estados tempranos de la germinación. Por otro lado, debido a la alta redundancia genética en plantas, la pérdida de función por una mutación ocasionalmente no produce fenotipos claros y provoca la necesidad de crear dobles o triples mutantes para el análisis de un gen, lo cual requiere largos periodos de análisis (6).

Metodologías alternativas a la mutación de genes para el estudio de la endocitosis, se desarrollaron a partir de la caracterización y el aislamiento del gen de la proteína verde fluorescente (GFP), y su posterior expresión en *Arabidopsis thaliana* (6). Realizando fusiones traduccionales entre la GFP o sus variantes fluorescentes y las proteínas que participan en la endocitosis, es posible marcar *in vivo* y visualizar el proceso endocítico y el sistema endomembranal de las células vegetales. Utilizando esta tecnología ha sido posible seguir a las proteínas residentes VHA1, RabA2 y RabA3 en la red del *trans*-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés, Trans-Golgi Network) que en plantas también tiene la función de endosoma temprano (EE, por sus siglas en inglés, Early Endosome). Así mismo, el cuerpo multivesicular (MVB, por sus siglas en inglés, Multivesicular Body) que en plantas funciona como endosoma tardío (LE, por sus siglas en inglés, Late Endosome) se ha estudiado por medio de los marcadores RabF2a, RabF2b y ESCRT (2, 6). Aunado al uso de proteínas fluorescentes, se han utilizado ampliamente técnicas bioquímicas como el fraccionamiento subcelular, la inmunoprecipitación y el análisis proteómico para la identificación y caracterización de los componentes implicados en la endocitosis y sus efectos en las proteínas cargo, que regula esta vía celular (5).

La microscopía de fluorescencia es una de las técnicas más recurridas, ya que permite la visualización *in vivo* del proceso endocítico. Las técnicas microscópicas, como la microscopía confocal de barrido (LSCM, por sus siglas en inglés, Laser Scanning Confocal Microscopy) es una de las técnicas de microscopía de fluorescencia más utilizada, ya que permite visualizar y analizar la dinámica a nivel subcelular de la molécula marcada fluorescente-

mente, además, también permite hacer ensayos de co-localización entre dos o más moléculas marcadas (2). Para analizar la dinámica de las vesículas endocíticas y del sistema endosomal, la microscopía confocal de disco giratorio (SDCM, por sus siglas en inglés, Spinning-Disk Confocal Microscopy) ha ayudado a reducir el tiempo en la adquisición de datos y ha aumentado la resolución espacial, dos aspectos favorables en el estudio de la dinámica endocítica, sin causar daño foto-tóxico a la muestra (5). Metodologías complementarias a LSCM y SDCM se pueden encontrar en la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM, por sus siglas en inglés, Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) y su variante, la microscopía de epifluorescencia de ángulo variable (VAEM, por sus siglas en inglés, Variable Angle Epifluorescence Microscopy), las cuales permiten observar eventos moleculares únicos y muy cercanos a la superficie celular. Por ello, estas metodologías son ideales para la observación y estudio de la endocitosis. Otro tipo de técnica microscópica útil para el análisis molecular de la endocitosis es la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés, Fluorescence Recovery After Photobleaching). El fotoblanqueo es la destrucción irreversible de un fluoróforo por una excesiva exposición a la luz. En FRAP, el fotoblanqueo se realiza en un punto muy específico de una célula en estudio dándole seguimiento a la recuperación de la fluorescencia en ese punto específico, generalmente por difusión del fluoróforo que se encuentra aledaño al punto de fotoblanqueo. Por lo tanto, FRAP permite determinar la dinámica y la difusión de proteínas (carga fluorescente) localizadas en la MP. (2). A la par de las técnicas microscópicas disponibles en la actualidad, se han desarrollado plataformas computacionales para el análisis cuantitativo de los datos obtenidos por estas tecnologías microscópicas (5).

BIOLOGÍA QUÍMICA Y SU USO EN EL ESTUDIO DE LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS

Mucho del conocimiento que se tiene sobre la endocitosis (para más detalles ver la revisión "Endocitosis en plantas (parte I): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas"), se ha desarrollado gracias al uso de compuestos químicos que inciden en el proceso endocítico (6). Estos compuestos se pueden categorizar como (Fig. 1 y Tabla 1): a) marcadores fluorescentes, b) inhibidores del tráfico vesicular, c) inhibidores del citoesqueleto, y d) inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina o CME. A continuación, se explica el efecto de estos compuestos sobre la endocitosis en las células vegetales y las

aportaciones que se han logrado por medio de su uso.

La biología química describe el uso de compuestos químicos para evaluar fenómenos biológicos por diferentes técnicas de análisis, y representa una forma de análisis alternativa a las metodologías que utilizan la mutación de genes (6). En contraste a la bioquímica, que estudia la química de las biomoléculas y sus vías de regulación en las células, la biología química consiste en aplicar compuestos que permiten estudiar un proceso biológico. El uso de la biología química ha sido significativo para entender los mecanismos de transporte y de regulación a diferentes niveles del sistema endomembranal (2, 6). Por ejemplo, usando un compuesto que inhibe el proceso endocítico, se pueden realizar análisis rápidos, dosis-dependientes y reversibles, lo cual evita los problemas de letalidad y de redundancia genética. Además, combinando la biología química, con las técnicas microscópicas como LSCM y SDCM, ha sido posible observar y caracterizar *in vivo* los efectos de estos compuestos en las células vegetales y realizar el análisis de proteínas de interés (2). Muchos de estos compuestos se comenzaron a utilizar debido a que se conocía su efecto en células animales y levaduras. A continuación, se recapitulan los compuestos que han permitido el avance del estudio de la endocitosis en plantas.

a) Marcadores fluorescentes de la endocitosis.

Los marcadores recurrentemente utilizados para seguir el proceso de endocitosis son los colorantes fluorescentes anfipáticos y selectivos de membrana FM4-64 (N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-dietilamino fenil hexatrienil) dibromo piridinio) y FM1-43 (N-(3-trietilamoniopropil)-4-(4-dibutilamino estirenil) dibromo piridinio). Estos compuestos fueron desarrollados por Betz y col, a partir de DASPMI (siglas de Dimetilaminoesterilmetilpiridinoamido) quienes los nombraron FM por la derivación del nombre Fei Mao, uno de los científicos que trabajaron en su desarrollo (7). Estos compuestos lipofílicos están formados por una cabeza di-catiónica, dos colas lipofílicas y un núcleo aromático. Son moléculas no fluorescentes en medio acuoso, pero al unirse a la cara externa de la MP a través sus colas lipofílicas, un medio hidrofóbico, se tornan fluorescentes. Una vez que se unen a la capa lipídica, estos colorantes se internalizan por la vía endocítica y se distribuyen por el sistema endosomal. Estas propiedades han sido cruciales para visualizar *in vivo* tanto la endocitosis como el tráfico vesicular asociado a FM1-43 y FM4-64 ya que difieren en su espectro de absorción y emisión, 502 nm y 625 nm para FM1-43; y 560 nm y 767 nm para FM4-64, lo cual está definido por las

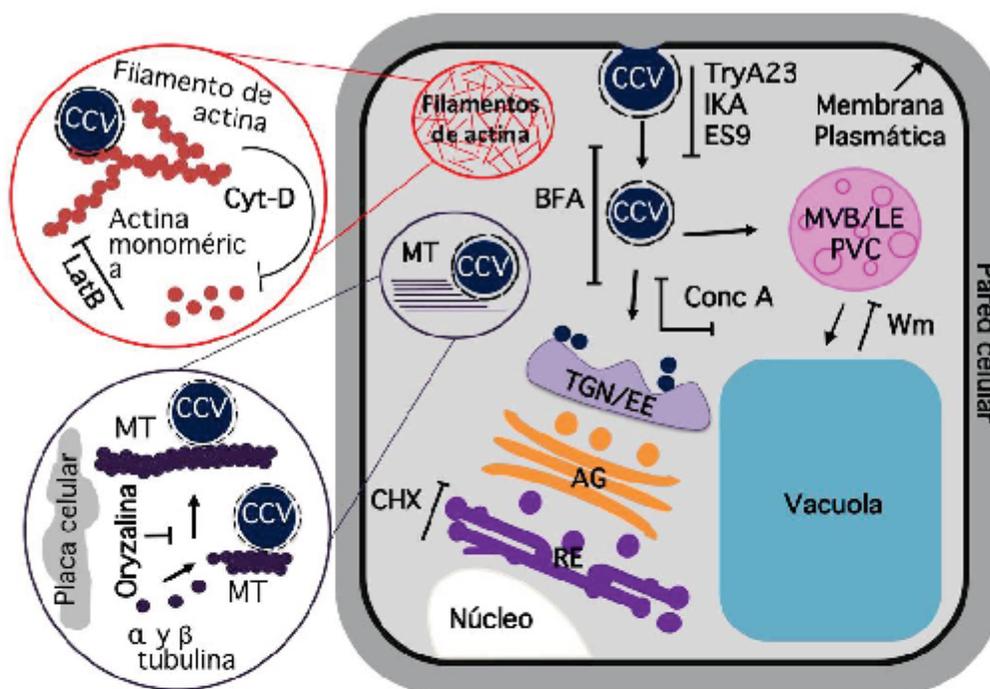


Figura 1. Descripción del efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre el tráfico vesicular en las células vegetales. Se muestran los diferentes componentes celulares implicados en el tráfico vesicular, MP, membrana plasmática; MVB/LE/PVC, cuerpo multivesicular/endosoma tardío/cuerpo prevacuolar; TGN/EE, red trans Golgi/endosoma temprano; AG, aparato de Golgi; RE, retículo endoplasmático; CCV, vesícula con cubierta de clatrina; MT, microtúbulos. Los inhibidores se muestran en abreviaturas, Wm, wormanina; BFA, brefeldina A; Conc A, concanamicina A; IKA, Ikarugamicina; TryA23, tirfostina A23; ES9, endosidina 9; CHX, cicloheximida; LatB, latrunculina B; citocalasina D, Cyt-D. Las flechas (→) indican la direccionalidad del tráfico endocítico, y las barras tipo (⊣) indican el proceso de inhibición directa o indirecta sobre la endocitosis.

propiedades químicas del núcleo de la molécula. El uso de estos compuestos como marcadores endocíticos es dependiente de tiempo y temperatura, pero no de pH (8). La caracterización de estos compuestos, que originalmente fueron desarrollados como sensores del potencial de membrana, se inició en neuronas y en terminaciones presinápticas. Su uso fue fundamental para caracterizar el reciclaje de las vesículas presinápticas en cultivos de células del hipocampo y en terminaciones nerviosas de anfibios. El uso de los marcadores FM en células vegetales fue crucial para la descripción de la endocitosis en plantas, debido a que utilizando el FM4-64 se describió que la endocitosis dependiente de clatrina ocurre en plantas y que es fundamental para la internalización de los transportadores de auxinas PIN (8, 9). Ade-

más, utilizando este compuesto junto con ensayos de co-localización, fue posible identificar que el TGN funciona como el EE en células vegetales, ya que es el primer sitio celular que recibe el material endocitado desde la MP (6, 10).

b) Inhibidores para evaluar el tráfico vesicular en plantas:

Brefeldina A

Brefeldina A (BFA) es una toxina lipofílica de origen fúngico que tiene como estructura química una lactona macrocíclica. Fue aislada de manera independiente por diferentes grupos de investigación entre los años de 1958 a 1970. Su interés

TABLA 1
Inhibidores directos e indirectos y su efecto en el proceso endocítico en células vegetales.

Inhibidor	Blanco molecular	Efecto del inhibidor sobre el proceso endocítico	Referencia
BFA	GNOM	Indirecto. Produce un conglomerado intracelular, denominado cuerpo de BFA. Bloquea el tráfico vesicular tanto de secreción como endocítico.	2, 5, 6, 11, 12
Conc A	Subunidad c de la porción V ₀ de las V-ATPasas	Indirecto. Deforma el AG e induce la acumulación de material recién endocitado, también bloquea el transporte de cargos hacia el MVB/LE/PVC y la vacuola.	2, 13, 14, 15
Wm	Subunidad catalítica de PI3K*	Indirecto. Induce la fusión homotípica y el abultamiento de MVB/LE/PVC, y la agregación y la estabilización de las fosas de clatrina en la MP. Evita el transporte hacia la vacuola.	2, 9, 16, 17
Latrunculina B	Actina monomérica	Indirecto. Inhibe la polimerización de nuevos filamentos de actina.	2, 18
Citocalasina D	Extremo barbado y filamentos de actina en crecimiento	Indirecto. Inhibe la asociación y disociación de la actina monomérica y globular al filamento de actina.	2
Oryzalina	Tubulina	Indirecto. Se une y forma complejos con tubulina, evitando la polimerización de los microtúbulos. Afecta el movimiento lateral de las fosas de clatrina en la MP.	2, 11, 20
IKA	No se conoce	Directo. Evita la maduración de CCVs y altera la morfología del AG.	2, 21, 22
TryA23	Subunidad μ del AP2	Directo. Bloquea la interacción entre la subunidad μ del complejo AP2 y el motivo YXXØ, presente en cargos internalizados por CME e interrumpe la asociación a la MP de la subunidad TCP del complejo TPLATE. También induce cambios en el pH intracelular.	2, 5, 23, 24
ES9	No se conoce	Directo. Actúa como un protonóforo y provoca la acidificación del citoplasma.	2, 5, 16, 25

*PI3K, cinasa de fosfatidil-inositol 3-fosfato

inicio por su efecto como anti-fúngico, antibiótico y fitotóxico (2, 6). Posteriormente se observó que BFA es un inhibidor del transporte intracelular de proteínas entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (AG) (Fig. 1). La incubación de las células animales con BFA altera la morfología y función del AG, provocando la fusión del AG con el RE, lo que subsecuentemente conduce a un bloqueo en el transporte de proteínas entre estos dos compartimentos celulares (2). Desde esta observación, diversos estudios se realizaron para conocer el modo de acción de este compuesto sobre la síntesis y transporte de proteínas a lo largo del sistema endomembranal. El efecto bioactivo del BFA se debe a que se une al dominio Sec7 de un intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, por

sus siglas en inglés, Guanine-nucleotide Exchange Factor) específico de factores de ribosilación de ADP (ARF, por sus siglas en inglés, Adenosine diphosphate Ribosylation Factor), factor que cambia el GDP unido al ARF-GEF (forma inactiva y soluble) por GTP (forma activa y asociada a la membrana). La unión de BFA al dominio Sec7 del ARF-GEF provoca la inhibición del intercambio GDP-GTP y, por ende, inhibe la actividad de las GTPasas tipo ARF, las cuales participan en el tráfico intracelular de vesículas y en la señalización celular (11). En células animales y levaduras los ARF-GEF sensibles a BFA están localizados en el AG y funcionan en el tráfico vesicular entre el AG y el RE, además participan en la formación de las vesículas COP1 y CCV en la membrana del AG, por lo cual BFA se

ha utilizado por excelencia como el inhibidor del tráfico vesicular asociado al AG (2). En células vegetales, uno de los blancos moleculares de BFA es el ARF-GEF conocido como GNOM, el cual funciona en el tráfico de proteínas entre endosomas y MP, y también en el reciclaje de cargos endocíticos. GNOM posee un dominio homólogo a Sec7 de ARF1, blanco característico de BFA (6). El tratamiento con BFA en plantas produce un conglomerado intracelular de TGN/EE, denominado cuerpo de BFA, el cual contiene tanto el material recién sintetizado, como también el endocitado (12). Por medio de la inducción de la formación de los cuerpos de BFA en células vegetales fue posible determinar que los transportadores PIN se movilizan de manera constitutiva entre la MP y los compartimentos endosomales. De hecho, la estrategia de visualización de proteínas marcadas fluorescentemente y asociadas a los cuerpos de BFA en las células tratadas con el inhibidor de síntesis de proteínas, cicloheximida (CHX), ha sido ampliamente utilizada para analizar el proceso de endocitosis en plantas (5). También utilizando BFA se ha identificado que el complejo TPLATE es necesario para la CME (5). Sin embargo, la interpretación del efecto del BFA en células vegetales es controversial, lo cual se debe a que las células vegetales poseen diversos tipos de ARF-GEF que están implicados en diferentes rutas de tráfico endomembranal provocando entonces la inhibición paralela de la vía endocítica y de las vías de transporte proteico entre el RE y el AG, así como del TGN al MVB que puede dirigir cargos hacia la degradación o hacia la vía de reciclaje. Por lo tanto, el BFA posee un amplio espectro de blancos moleculares, además en plantas existen ARF-GEF insensibles al efecto de BFA (12). Estas características dificultan en ocasiones la caracterización específica de ciertos blancos de la maquinaria endocítica o cargos de esta vía celular. Por ello, el desarrollo y estudio de compuestos bioactivos más selectivos de la vía endocítica, constituyen una alternativa para el estudio de este proceso en células vegetales.

Concanamicina A

Concanamicina A (Conc A; Fig. 1) es un antibiótico utilizado como inhibidor del tráfico vesicular; su estructura química consta de un anillo macrocíclico de lactona de 18 residuos. Este antibiótico fue aislado de *Streptomyces diastatochromogenes* y nombrado por su actividad como inhibidor de la proliferación de células T estimuladas con la lectina concanavalina A (2, 13). Posteriormente se encontró que Conc A es un compuesto que inhibe la función de las H⁺-ATPasas vacuolares (V-ATPasas), las

cuales son transportadores primarios presentes en todos los eucariontes, importantes para energizar las membranas celulares y mantener el pH en el sistema endomembranal (14). Estos complejos multi-enzimáticos están conformados por la porción V₁ (subunidades A a H) catalizadora de ATP, y la porción V₀ (subunidades a, c, c', c'', d, e) unida a la membrana y translocadora de protones. Conc A se une a la subunidad c de la porción V₀ inhibiendo la rotación del complejo y por lo tanto la translocación de protones. El uso de Conc A como un inhibidor del tráfico vesicular en plantas, inició al analizar la localización subcelular de la subunidad a de la V-ATPasa (VHA-a1) (14). En este estudio, se identificó que la VHA-a1 se localiza tanto en la membrana de la vacuola, como en TGN. Por medio del uso de Conc A se demostró que en plantas TGN también funciona como el EE ya que es el sitio celular donde las vías endocíticas y de secreción convergen en las células vegetales (14). Conc A bloquea el transporte de protones en la porción V₀ de la V-ATPasa, produciendo la deformación del AG, también induce la acumulación de material recién endocitado y sintetizado en el TGN, lo cual bloquea su transporte hacia la vacuola o hacia la MP, respectivamente. Así mismo, utilizando Conc A fue posible determinar que el TGN madura para formar el MVB (15). Por lo tanto, el uso de este inhibidor permitió elucidar aspectos relevantes del funcionamiento del sistema endomembranal en las células vegetales y constituye, así como la BFA, una herramienta para inhibir de manera indirecta la vía endocítica.

Wortmanina

Wortmanina (Wm) es un metabolito esteroideo aislado de diferentes especies de hongos, entre ellos *Penicillium wortmanni*, *Talaromyces wortmannii*, *Myrothecium roridum* y *Fusarium oxysporum* (2, 16). Se identificó como un inhibidor específico que se une covalentemente a la subunidad catalítica de la cinasa de fosfatidil-inositol 3-fosfato, enzima que produce el fosfatidil-inositol 3-fosfato, a partir de fosfatidil-inositol 4, 5-bifosfato (2, 17). Debido a que el fosfatidil-inositol 3-fosfato es un lípido característico de las membranas endosomales, se analizó su efecto en la vía endocítica en mamíferos, donde se observó que inhibe la endocitosis. El uso de Wm para el estudio de la endocitosis en plantas inicio con el trabajo de Emans y col (9), quienes utilizaron este inhibidor para caracterizar los marcadores fluorescentes FM como indicadores de endocitosis en plantas y observaron que, al tratar a las células vegetales con este compuesto la toma de FM1-43 se inhibe (9). En la actualidad, se conoce

d) Inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina.

Ikarugamicina

Ikarugamicina (IKA) es un antibiótico con actividad antiprotozoaria aislado de *Streptomyces phaeochromogenes* sp. *ikaruganensis*. El efecto de la IKA sobre la CME se descubrió al analizar la internalización de versiones oxidadas de lipoproteínas de baja densidad en macrófagos (2, 21). En un estudio posterior, se encontró que en células monocíticas el tratamiento con IKA inhibe la endocitosis de CD4 inducida por la fosfoproteína Nef del virus del VIH (22). El modo de acción de IKA sobre la CME no se tiene bien definido, pero se conoce que la presencia de IKA provoca la redistribución de la CHC y del complejo hetero-tetramérico adaptador de clatrina 2 (AP2), claves para la formación de las CCV, del citoplasma a la MP. El tratamiento con IKA conlleva a la agrupación proteica no funcional que evita la maduración a CCVs y altera la morfología del AG, el cual se observa más desorganizado y vesiculado (22). Su uso en plantas inició al estudiar la endocitosis en protoplastos de tabaco y en los tubos polínicos, lo cual permitió esclarecer que IKA es un compuesto que también inhibe la CME en plantas (Fig. 1), además de que permitió elucidar que en el tubo polínico existen dos zonas endocíticas activas, la zona apical y la zona lateral y la presencia de un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina, el cual es insensible a IKA (2, 22). Debido a que no se conoce el blanco molecular de IKA, su uso para estudiar la CME en plantas, debe ser cuidadoso y utilizando los controles necesarios para permitir ver su efecto dentro del sistema con el que se está trabajando.

Tirfostina A23

Tirfostina A23 (TyrA23), un inhibidor de la CME, es un análogo estructural a la fosfotirosina (2) (Fig. 1). Este inhibidor fue inicialmente desarrollado como un sustrato competitivo de cinasas de tirosina. Posteriormente se observó que inhibe la endocitosis del receptor de transferrina en células de mamífero, ya que bloquea la interacción entre la subunidad μ del AP2 y el motivo citosólico YXX \emptyset (donde Y es tirosina, X cualquier aminoácido y \emptyset representa un aminoácido hidrofóbico), presente en muchos de los cargos internalizados por CME (23). La inhibición de esta interacción provoca que los cargos que contienen el motivo YXX \emptyset no puedan incorporarse a las CCVs, inhibiendo así su endocitosis. El uso del TyrA23 en células vegetales, inició al caracterizar la expresión heteróloga del receptor de transferrina de mamífero en protoplastos de *A. thaliana* tratados

con FM4-64 y TyrA23 donde se observó que TyrA23 inhibe la endocitosis de este receptor (24). A partir de este estudio muchos grupos de investigación han utilizado TyrA23 como un inhibidor de la CME, para analizar la regulación de la endocitosis de proteínas de membrana involucradas en procesos tales como: la absorción de nutrientes, la defensa a patógenos y en la respuesta a estrés abiótico. En plantas, se demostró que TyrA23 no solo inhibe la asociación de la subunidad μ a MP sino también de las subunidades α y σ del complejo AP2. Además, interrumpe la asociación a la MP de la subunidad TCP del complejo TPLATE, que participa en la formación de CCVs y en la CME (2). Recientemente se encontró que, además de los efectos ya descritos, TyrA23 produce la acidificación del citoplasma en células de *A. thaliana* y, al parecer, cambios en el pH intracelular conllevan a efectos negativos en la maquinaria implicada en la CME (5).

Endosidinas

Las endosidinas (ES) son un grupo de compuestos orgánicos que forman parte de grandes colecciones o librerías (aproximadamente 60,000) de compuestos bioactivos (interfieren con funciones biológicas) comercializados por Chembridge Corp. y MicroSource Discovery Systems Inc. Las ES fueron identificadas por tamizaje de estas librerías buscando moléculas que afectan la endocitosis y la función endosomal (25). El blanco funcional o molecular de algunas de las endosidinas ha sido caracterizado. Por ejemplo, la endosidina 5 (ES5), inhibe el reciclamiento de proteínas a MP (16). Las ES1, ES2 y ES16 afectan el tráfico *post*-Golgi y la función endosomal (2, 5). Particularmente, ES9 inhibe la CME del receptor de transferrina en células animales y de FM4-64 en células vegetales. Actualmente se conoce que el modo de acción de ES9 es parecido al efecto de TyrA23, ya que actúa como un protonóforo y provoca la acidificación del citoplasma (5) (Fig. 1).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El conocimiento sobre la vía endocítica en plantas ha permitido definirla como un proceso fundamental para el desarrollo, la respuesta a estímulos y la señalización vegetal. Hoy en día sabemos que la endocitosis de proteínas provoca una respuesta a nivel celular que impacta en la homeostasis general de toda la planta. Es por esto que resulta importante caracterizar la maquinaria molecular implicada en este proceso. En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para comprender, a nivel molecular, el funcionamiento de la endocitosis en plantas.

Esto se ha podido lograr, no solamente mediante el análisis de las proteínas que forman parte de la maquinaria y los cargo endocíticos, sino en buena parte gracias al uso de inhibidores de la endocitosis (Tabla 1). El uso de estos compuestos ha permitido elucidar la dinámica, eficiencia y selectividad del sistema endomembranal en las células vegetales. Además, la investigación acerca del efecto de es-

tos compuestos y su clasificación como moléculas que actúan de manera directa o indirecta sobre la endocitosis resulta importante para continuar con la investigación de este proceso. Así mismo, la identificación de más compuestos que inhiban de manera directa la endocitosis a diferentes niveles es una necesidad para continuar la investigación en esta área de la biología vegetal. 

REFERENCIAS

- Doherty JG, McMahon TH (2009). Mechanism of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902.
- Šamaj J (2012). *Endocytosis in plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, p 333.
- Robinson GD, Jiang L, Schumacher K (2008). The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol* 147:1482-1492.
- Hilmer S, Depta H, Robinson DG (1986). Confirmation of endocytosis in higher-plant protoplasts using lectin-gold conjugates. *Eur J Cell Biol* 41:142-149.
- Reynolds G, Wang C, Pan J, Bednarek SY (2018). Inroads into internalization: Five years of endocytic exploration. *Plant Physiol* 176:208-218.
- Norambuena L, Tejos R (2017). Chemical genetic dissection of membrane trafficking. *Annu Rev Plant Biol* 68:197-224.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* 214:159-173.
- Dhonuskhe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carries in Arabidopsis. *Curr Biol* 17:520-527.
- Emans N, Zimmerman S, Fischer R (2002). Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14:71-86.
- Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T (2008). Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *Plant J* 53:237-247.
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherflis J, Jackson CL (1999). Brefeldin A acts to stabilize and abortive ARF-GDP-Sec7 domain proteins complex: Involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 3:275-285.
- Robinson DG, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C, Hawes C (2008). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Tr Plant Sci* 13: 405-408.
- Dröse S, Altendorf K (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 200:1-8.
- Dettmer J, Hong-Germesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:715-730.
- Scheuring D, Viotti C, Krüger F, Künzl F, Sturm S, Bubeck J, Hillmer S, Frigerio L, Robinson DG, Pimpl P, Schumacher K (2011). Multivesicular bodies mature from Trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 3463-3481.
- Brian PW, Curtis PJ, Hemming HG, Norris GLF (1957). Wortmannin, and antibiotic produced by *Penicilium wortmannin*. *Trans Br Mycol Soc* 40: 365-368.
- Arcaro A, Wymann MP (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296: 297-301.
- Jeng RL, Welch MD (2001). Cytoskeleton: Actin and endocytosis- no longer the weakest link. *Curr Biol* 11: R691-R694.
- Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989). Latruncilins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:127-144.
- Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer J, Bajer AS, Fosket DE (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172:252-264.

21. Hasumi K, Shinohara C, Naganuma S, Endo A (1992). Inhibition of the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophage J774 by the antibiotic ikaguramycin. *Eur J Biochem* 205: 841-846.
22. Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, Onelli E, Cresti M, Santo N, Idilli A (2007). Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J Cell Sci* 120:3804-3819.
23. Bandury DN, Oakley JD, Sessions RB, Banting G (2003). Tryphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 278:12022-12028.
24. Ortiz-Zapater E, Soriano-Ortega E, Marcote MJ, Ortiz-Masia D, Aniento F (2006). Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tryphostin A23 and brefeldin A. *Plant J* 48:757-770.
25. Drakakaki G, Robert S, Szatmari AM, Brown MQ, Nagawa S, Van Damme D, Leonard M, Yang Z, Girke T, Schmid SL, Russinova E, Friml J, Raikhel NV, Hick GR (2011). Clusters of bioactive compounds target dynamic endomembrane networks in vivo. *Proc Nat Acad Sci, USA* 108:17850-17855.



Rhizobium etli CE3-DsRed pMP604: a useful biological tool to study initial infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation

Raúl Dávila-Delgado¹ · Luis Alfredo Bañuelos-Vazquez² · Elizabeth Monroy-Morales¹ · Rosana Sánchez-López¹ Received: 19 February 2020 / Accepted: 22 September 2020 / Published online: 29 September 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Main conclusion *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604 drives infection 12–24 h earlier than *R. etli* CE3-DsRed and it is an excellent tool in live-cell imaging studies of IT development in *P. vulgaris* roots.

Abstract The study of the cellular dynamics of nodulation has frequently been limited by the difficulty of performing live-cell imaging in nodule primordia and legume roots, which are constituted by multiple cell layers, such is the case of *Phaseolus vulgaris*. Seeking conditions to reduce the time it takes for rhizobia to infect *P. vulgaris* root, we decided to explore the nodulation properties of *Rhizobium etli* CE3 pMP604, a strain that constitutively produces Nod factors through a flavonoids-independent transcriptional activation which is often used to purify Nod factors. Even though the strain infects 12–24 h earlier than the parental *R. etli* CE3 strain, infection thread (IT) formation, nodule organogenesis processes and N₂-fixation activity are similar for both strains. Additionally, we have confirmed that *R. etli* CE3-DsRed pMP604 is an excellent tool to trace IT development in *P. vulgaris* roots.

Keywords Flavonoids-independent transcription · Infection thread · Live-cell imaging · Nod factors · Rhizobia

Abbreviations

dpi Days post-inoculation
hpi Hours post-inoculation
IC Infection chamber
IT Infection thread

Introduction

According to our current understanding, the origin of the co-evolutionary relationship between legume and soil bacteria took place 59 million years ago (Sprent and James 2007). This adaptive process established the morphogenetic basis that led to the development of a new organ on legume root infected with rhizobia, the symbiotic nitrogen-fixing nodule. Depending on the compatibility between the legume and the rhizobia, nodules display two types of growth: indeterminate (e.g. *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* and *Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum*) which is originated from the proliferation of pericycle and inner cortex cells, it has a persistent apical meristem and an oval shape, or determinate (e.g. *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti* and *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli*) in which nodule development is initiated by the cell division of outer cortical cells, the meristem is not persistent and the nodule ends up having a spherical shape. Regardless of the nodule type, its full development is complex and involves two well-conserved and highly coordinated processes, rhizobia infection and nodule organogenesis (Oldroyd and Downie 2008). In general terms, the onset of nodulation is mediated by a

Communicated by Dorothea Bartels.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03479-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rosana Sánchez-López
rosana@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

² Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

molecular dialogue established when flavonoids secreted by the compatible legume root are specifically detected by the transcriptional activator NodD present in the membrane of the suitable rhizobia. NodD is a positive regulator of the bacterial *nodABC* genes, responsible for the synthesis and secretion of bacterial lipochitooligosaccharides, known as Nod factors (Rosson et al. 1985; Schlaman et al. 1989). Perception of Nod factors by specific LysM receptor-like kinases induces an apical curvature in growing root hairs, where the bacteria get trapped in an infection chamber (IC) and form a microcolony. Subsequently, the rhizobia enter the root through an invagination induced in the root hair to form a tubular, transcellular structure, named infection thread (IT), which elongates along the root hair guiding the proliferating bacteria towards the cortical zone. Concomitantly, the cortical cells divide to form a nodule primordium. As the young nodule emerges, the bacteria are released from the IT into membrane-bound symbiosomes within host cells located in the central zone of the nodule, where bacteria differentiate into bacteroids capable of fixing nitrogen. A vascular system is distributed within the nodule inner cortex (Oldroyd and Downie 2008). In our model, *P. vulgaris* roots inoculated with *R. etli* or *R. tropici*, a nodule typically reaches its N_2 fixation maturity, with a mean diameter of 1.5–2.5 mm, approximately 18–21 days after inoculation (dpi) (Sánchez-López et al. 2011).

In the last years, we have been engaged in studying the role played by a battery of genes involved in *P. vulgaris* nodule development, such as *PvSYMRK*, *PvRBOHB*, *PvRBOHA*, *PvAnn1*, among others currently being characterized. A variety of strategies were applied in those studies, including gene silencing, promoter characterization, and in vivo cytolocalization, among others (Sánchez-López et al. 2011; Montiel et al. 2012; Arthikala et al. 2017; Carrasco-Castilla et al. 2018). Our findings have driven us to address the cell biology of the infection process by live-imaging microscopy, a difficult task considering that *P. vulgaris* root section containing rhizobia microcolonies (48–72 h post inoculation, hpi) is approximately 1.5 mm thick. An additional concern to take in account regards the rhizobial-infection efficiency in *P. vulgaris* transgenic hairy roots, which tends to be a bit lower than in wild-type roots (unpublished data).

Looking for an alternative protocol, here we have explored the infectious and nodulation potential of *R. etli* CE3 pMP604 strain, in which the plasmid pMP604 encodes a hybrid *nodD* gene that confers flavonoids-independent transcription activation of rhizobia nod genes and, consequently, secretion of Nod factors is constitutive (Spaink et al. 1989). The chemical structure and biological activity of Nod factors secreted by this strain have been well documented (Cárdenas et al. 1995, 1998; Zepeda et al. 2014; Formey et al. 2016). Our findings demonstrated that *R. etli* CE3 pMP604 and its fluorescent version infect *P. vulgaris* roots

12–24 h earlier than the parental strain and highlight their potential as a tool for live-cell imaging studies on early steps of rhizobia infection in the model legume *P. vulgaris*.

Materials and methods

Plant materials, inoculation and growth conditions

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv “Negro Jamaica”) seeds were obtained from local farmers, Morelos, Mexico. Seeds were germinated and seedlings planted in pots with autoclaved vermiculite, grown in a chamber at 27 ± 1 °C under 16 h of photoperiod and watered with Fähræus solution (Fähræus 1957) twice a week, as described (Estrada-Navarrete et al. 2007). *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3-pMP604, as well as, their fluorescent version, were grown in PY medium supplemented with 7 mM $CaCl_2$, 20 $\mu g\ ml^{-1}$ nalidixic acid, 100 $\mu g\ ml^{-1}$ streptomycin and 5 $\mu g\ ml^{-1}$ tetracycline, the latter only in the case of *R. etli* CE3 pMP604. Growth curves were established in 96-well plates containing 180 μl of PY medium inoculated with either *R. etli* CE3 strain at an initial optical density of 0.025 at 600 nm and incubated at 30 °C with shaking in a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). When indicated, seedlings were inoculated with *R. etli* CE3, *R. etli* CE3 pMP604 or their fluorescent version grown at log phase, washed with 10 mM $MgSO_4$ and diluted to give 0.05 optical density at 600 nm.

Analysis of infection threads, nodule number and nodule diameter

Wild-type roots inoculated with *R. etli* CE3 or *R. etli* CE3 pMP604 were collected at either 12, 24, 36, 48 and 72 hpi or 5, 14 and 21 days post-inoculation (dpi), clarified with 20% commercial sodium hypochlorite for 30 min and dyed with 0.001% methylene blue during 10 s. Infection threads were counted by direct observation in a Nikon TE300 inverted microscope (40 \times objective lens; Nikon Instruments, Tokyo, Japan). Nodulated roots, carefully placed in a 150 mm Petri dish, were digitized using an Epson Scanner Perfection 4490 (Los Alamitos, CA, USA) at 2400 dpi in TIFF format (6108 \times 6108 pixels). Nodule number and nodule diameter were determined using ImageJ 1.50i software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Dyed nodules were delimited using the oval tool and data from each image file were saved as Region of Interest (ROI). Quantification was performed with the option Measure, which includes a previously configured Feret’s diameter parameter in Set Measurements.

Acetylene reduction

Nitrogenase activity was estimated using the acetylene reduction assay (ARA), which is based on the reduction of acetylene gas to ethylene, as described by Hardy et al. (1968). Briefly, nodulated roots were harvested at the indicated time points and incubated in acetylene gas for 30 min, and acetylene reduction was quantified using gas chromatography (Variant model 3300 chromatograph).

Tagging of the chromosome of *R. etli* CE3 with a DsRed cassette and transfer of plasmid pMP604 by conjugation

Rhizobium etli CE3-DsRed was created by chromosome tagging *R. etli* CE3 with a Mini-Tn7 delivery plasmid expressing DsRed fluorescent protein, as described by Lambertsen et al. (2004). Conjugation experiments to generate *R. etli* CE3-DsRed pMP604 were performed, as defined by Torres-Tejerizo et al. (2015). Briefly, overnight cultures of donor (*E. coli* S17.1) and recipient (*R. etli* CE3-DsRed) strains were mixed in a 1:2 volume ratio and incubated on PY plates at 30 °C for 18–24 h. Bacterial mixtures were re-suspended in 1 ml of 10 mM MgSO₄, 0.01% tween40 (v/v) and serial dilutions were plated on selective PY medium supplemented with nalidixic acid 20 µg ml⁻¹, gentamicin 30 µg ml⁻¹. The presence of plasmid pMP604 in *R. etli* CE3-DsRed pMP604 transconjugants was confirmed by Eckhardt gels (Eckhardt 1978).

Microscopy analysis

Infection thread images from *P. vulgaris* roots inoculated with *R. etli* CE3-DsRed or *R. etli* CE3-DsRed pMP604 were captured using a 3I Marianas Confocal Spinning Disk Microscope (Intelligent Imaging Innovations Ltd, London, UK) coupled to a Zeiss Observer Z.1 Inverted type (water×40 objective 0.75 N.A., Zeiss, Jena, Germany) and an Andor Ixon 3 EMCCD camera, model DU-897E-CS0-#BV (Andor Technology Ltd, Oxford Instruments, Belfast, UK) and controlled by SlideBook6 (Intelligent Imaging Innovations). DsRed was excited at 561 nm, and fluorescence emission was collected at 583 nm.

Statistical analysis

Data were compared using Student's (paired *t* test) or ANOVA tests, and statistical *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant and are indicated by asterisks in figure legends. Statistics were conducted using GraphPad Prism version 6 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Results and discussion

The biological activities of Nod factors isolated from *R. etli* CE3 pMP604 include the capacity to induce cortical cell division and the formation of nodule primordia in a dose-dependent manner in *P. vulgaris* wild-type roots (Cardenas et al. 1995). In this study, we have explored the potential of *R. etli* CE3 pMP604, a flavonoids-independent transcription activation conferring strain, as a tool to generate ITs and nodules earlier than *R. etli* CE3, meaning reducing the typically 72–96 hpi lag time that precedes the formation of rhizobia microcolonies and ITs.

R. etli CE3 pMP604 capability to generate N₂-fixing nodules

As illustrated in Fig. S1, a culture of *R. etli* CE3 pMP604 presents growth rate as the parental *R. etli* CE3 strain. To investigate how efficiently *R. etli* CE3 pMP604 can generate nodules, two aspects were taken in account, the number of nodules developed on wild-type *P. vulgaris* roots at different post-inoculation time points and, considering that rhizobial infection events and nodule organogenesis are continuous, the diameter of each nodule, as a criterion to assess the nodule development process. We have established an image analysis pipeline to address the nodulation in roots infected with either the parental strain or *R. etli* CE3 pMP604. A comparative analysis shown in Fig. 1a indicates that at 5 dpi, there are three times more nodules per plant on roots inoculated with *R. etli* CE3 pMP604 compared to *R. etli* CE3 strain. As the nodulation period extends, the number of nodules per plant tends to be similar at 21 dpi, regardless the rhizobia strain. We also found that at all time points, the roots inoculated with either *R. etli* strain have a similar frequency distribution pattern for nodule diameter (Fig. 1b). From these results, it is worth noting that even though the nodulation in the roots inoculated with *R. etli* CE3 pMP604 seems to be initiated earlier, neither the number of nodules nor their development are apparently affected by the constitutive secretion of Nod factors. To address the functionality of the nodules generated by infection with CE3 pMP604, we performed a comparative analysis of their N₂-fixing potential. At 14 dpi, the nodules harvested from roots inoculated with *R. etli* CE3 pMP604 fixed twice more nitrogen than nodules infected with *R. etli* CE3 strain (Fig. 1c). However, at 18 and 21 dpi, nodules generated by either strain reached a comparable N₂-fixation potential. Altogether, these data reinforce the observation that *R. etli* CE3 pMP604 induces a functional nodulation in a time lapse shorter than the parental CE3 strain. Nevertheless, the host plant keeps the control over the auto-regulation of nodulation, preventing the excessive formation of mature nodules (Ferguson et al. 2019).

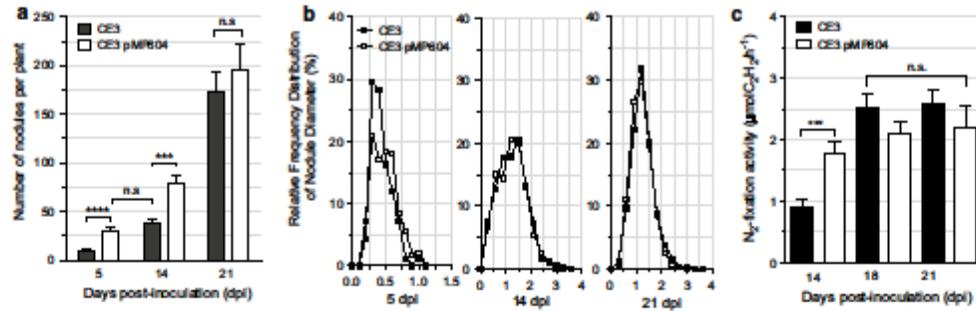


Fig. 1 Nodulation properties of *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3 pMP604. **a** Determination of the number of nodules per plant. Nodulated roots were harvested at the indicated time points, then stained with methylene blue, cleared in sodium hypochlorite and digitized. Number of nodules per plant were counted using tools of ImageJ 1.50i software. Mean values from three independent experiments ($n=15-17$) were plotted with GraphPad Prism version 6. Error bars represent \pm SE. Statistical significance between values of *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3 pMP604 indicated by *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$, unpaired Student's two-tailed t test. ns indicates no statistically significant ($P > 0.05$). **b** Relative frequency distribution of the diameter of nod-

ules from data in **a**, and correspond to $n=166$ (CE3) and 509 (CE3 pMP604) nodules from 5 dpi, 581 (CE3) and 1341 (CE3 pMP604) from 14 dpi, 2949 (CE3) and 2940 from 21 dpi. No statistical difference was found (ns, $P > 0.05$, unpaired Student's two-tailed t test). **c** Mean values of N_2 -fixation potential from three independent experiments performed at 14 ($n=27$), 18 ($n=23$) and 21 dpi ($n=20$). Error bars represent \pm SE. Statistical significance between values of *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3 pMP604 from 14 dpi data are indicated by *** $P < 0.0005$ unpaired Student's two-tailed t test). No statistical difference was found between data from 18 and 21 dpi (ns, one-way ANOVA)

Infection events

We have also addressed the competence of *R. etli* CE3 pMP604 to induce the primary events of the symbiotic interaction between *P. vulgaris* roots and rhizobia. We have assessed it by counting the infection events at different post-inoculation time points with either the parental strain or *R. etli* CE3 pMP604 (Fig. 2a). No signs of root hair–rhizobia interaction were observed at 12 or 24 hpi in either group of inoculated roots; however, a specific root hair swelling effect cannot be ruled out since the bleach treatment used for root clearing can cause spurious deformations in the radical hairs. First infection events in roots inoculated with CE3 pMP604, mainly bacteria trapped in curled root hairs, were observed as soon as 36 hpi, whereas CE3-inoculated roots required 48 hpi (Fig. 2a). At this time point, the sites of infection in *R. etli* CE3 pMP604-inoculated roots were abundant and enriched in ICs and ITs, in some of them, division of cortical cells adjacent to the infection site (IT + CCD) was observed (Fig. 2b). At 72 hpi, the number of infection events for both strains was higher than observed at 48 hpi (Fig. 2a), some of the infections were present in dividing cells within the nodule primordia (Fig. 2b). These results showed that *R. etli* CE3 pMP604 initiates the infection process 12–24 h earlier than the parental strain and activates the nodule organogenesis program without apparent alterations to that observed in control roots inoculated with the *R. etli* CE3 strain.

Live-Imaging of infection threads

Our primary purpose in characterizing the strain *R. etli* CE3 pMP604 was to have a biological fluorescent tool that allows us a fast and easy identification of rhizobia infection sites, as well as the study of the IT formation and progression in *P. vulgaris* roots, as soon as 36–40 hpi. To achieve this, we have tagged the chromosome of *R. etli* CE3 pMP604 with a DsRed expression cassette. As a reference, the strain *R. etli* CE3-DsRed was also created. As expected, both rhizobial strains expressing DsRed conserved the same rate and kinetics of infection and IT development as *R. etli* CE3 pMP604 and *R. etli* CE3. A typical initiation of the nodulation process was observed at 36 hpi on roots inoculated with *R. etli* CE3-DsRed, as indicated by the presence of deformed (apex swelling) root hairs surrounded by bacteria (Fig. 2c). Curled root hairs trapping rhizobia were visualized as early as 48 hpi, and ITs were easily distinguished at 72 hpi (Fig. 2d, e). In contrast, ICs and ITs containing *R. etli* CE3-DsRed pMP604 were observed earlier than in *R. etli* CE3-DsRed infected roots (compare Fig. 2c and d). Branched ITs were detected in roots inoculated with the strain CE3-DsRed pMP604 at 72 hpi (Fig. 2e), but it was at 96 hpi that ITs with branches were found in roots inoculated with the parental DsRed strain (data not shown). Therefore, beyond the fact that the infection is established 12–24 h earlier, the high rate of infection events in roots infected with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 (Fig. 2a) offers an advantage when the purpose

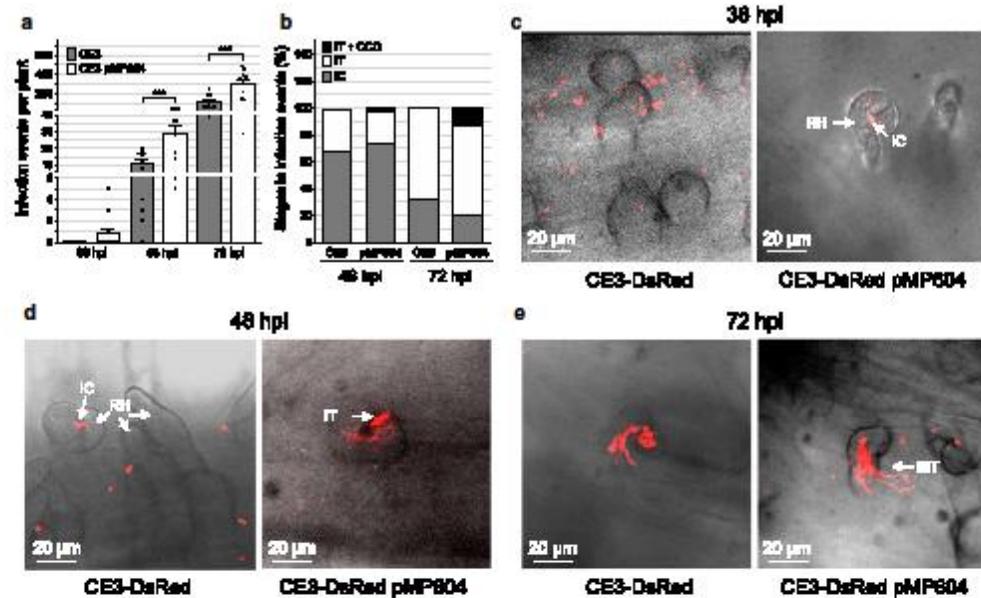


Fig. 2 Infection events in roots inoculated with *R. etli* CE3 or *R. etli* CE3 pMP604. **a** Mean of the number of infection events per plant determined in three independent experiments ($n=10$) performed at 36, 48 and 72 hpi. Error bars represent \pm SE. Statistical significance between values of *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3 pMP604 is indicated by *** $P<0.001$. **b** Stages in infection events (percentage): infection chamber (IC), infection threads (IT), infection thread and division of

cortical cells adjacent to the infection site (IT + CCD). **c–e** Representative images of initial steps of infection in roots inoculated either with *R. etli* CE3-DsRed or *R. etli* CE3-DsRed pMP604 and harvested at 36, 48 and 72 hpi. Images were captured in a Confocal Spinning Disk Microscope. *BIT* branched infection thread, *IC* infection chamber, *IT* infection thread, *RH* root hair

is to visualize root hairs containing an IC and trace IT in their formation, elongation or branching stages. *R. etli* CE3-DsRed pMP604 is a valuable tool in studies of the dynamics of the infection thread by live-cell imaging in thick roots as in *P. vulgaris*.

Author contribution statement RDD, LABV and EMM performed the experiments described in the manuscript; RSL conceived and coordinated the project. RDD and RSL co-wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

Acknowledgements We thank M.Sc. Andrés M. Saralegui Amaro and Dr. J. Arturo Pimentel Cabrera (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, UNAM) for technical assistance in confocal microscopy and Alfonso Leija Salas (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM) for acetylene reduction assays. We also thank Shirley E. Ainsworth for library services, Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez, Omar Arriaga, and Arturo Ocaídiz for computer services. We are grateful to Drs. Claudia L. Treviño and Julio C. Chavez

for their technical advice, Enrique Merino (Instituto de Biotecnología, UNAM) and Susana Brom (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM) for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by DGAPA-UNAM (IN207215 and IN206118 to RSL) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) with PhD fellowships to RDD (288601), LABV (384814) and EMM (595064).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Arthikala MK, Montiel J, Sánchez-López R, Nava N, Cárdenas L, Quinto C (2017) Respiratory burst oxidase homolog gene A is crucial for *Rhizobium* infection and nodule maturation and function in common bean. *Front Plant Sci* 23(8):2003. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02003>

Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of

- the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* 29(3):453–464. <https://doi.org/10.1007/bf00020977>
- Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler FK, Quinto C (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol* 116(3):871–877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>
- Carrasco-Castilla J, Ortega-Ortega Y, Jáuregui-Zuniga D, Juárez-Verdoyes MA, Arthikala MK, Monroy-Morales E, Nava N, Santana O, Sánchez-López R, Quinto C (2018) Down-regulation of a *Phaseolus vulgaris* annexin impairs rhizobial infection and nodulation. *Environ Exp Bot* 153:108–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.016>
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1(4):584–588. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(78\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0147-619x(78)90016-1)
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* 2(7):1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Párraga G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16(2):374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ* 42(1):41–51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Forney D, Martín-Rodríguez JA, Leija A, Santana O, Quinto C, Cárdenas L, Hernández G (2016) Regulation of small RNAs and corresponding targets in nod factor-induced *Phaseolus vulgaris* root hair cells. *Int J Mol Sci* 17(6):887–902. <https://doi.org/10.3390/ijms17060887>
- Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43:1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
- Lambertsen L, Sternberg C, Molin S (2004) Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* 6(7):726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- Montiel J, Nava N, Cárdenas L, Sánchez-López R, Arthikala MK, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by rhizobia. *Plant Cell Physiol* 53(10):1751–1767. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs120>
- Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59(1):519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Rossen L, Johnston AWB, Downie JA (1985) DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes nodAB and C required for root hair curling. *Nucleic Acids Res* 12(24):9497–9508. <https://doi.org/10.1093/nar/12.24.9497>
- Sánchez-López R, Jáuregui D, Nava N, Alvarado-Affantranger X, Montiel J, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2011) Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ* 34(12):2109–2121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02408.x>
- Schlaman HRM, Spaik HP, Okker RJH, Lugtenberg BJJ (1989) Subcellular localization of the nodD gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 171(9):4686–4693. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4686-4693.1989>
- Spaik HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Tak T, Goossende Roo L, Pees E, van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ (1989) Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid nodD product. *J Bacteriol* 171(7):4045–4053. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.4045-4053.1989>
- Sprent JI, James EK (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol* 144(2):575–581. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096156>
- Torres-Tejerizo G, Bañuelos LA, Cervantes L, Gaytán P, Pistorio M, Romero D (2015) Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods* 117:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.005>
- Zepeda I, Sánchez-López R, Kunkel J, Bañuelos LA, Hernández-Barrera A, Sánchez F, Quinto C, Cárdenas L (2014) Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing *Phaseolus vulgaris* root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* Nod factors. *Plant Cell Physiol* 55(3):580–592. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp1202>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Rhizobia induce SYMRK endocytosis in *Phaseolus vulgaris* root hair cells

Raúl Dávila-Delgado¹ · Karen Flores-Canul¹ · Marco Adán Juárez-Verdayes¹ · Rosana Sánchez-López¹ Received: 15 August 2022 / Accepted: 6 March 2023 / Published online: 16 March 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Main conclusion *PvSYMRK-EGFP* undergoes constitutive and rhizobia-induced endocytosis, which rely on the phosphorylation status of T589, the endocytic YXXØ motif and the kinase activity of the receptor.

Abstract Legume-rhizobia nodulation is a complex developmental process. It initiates when the rhizobia-produced Nod factors are perceived by specific LysM receptors present in the root hair apical membrane. Consequently, SYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase) becomes active in the root hair and triggers an extensive signaling network essential for the infection process and nodule organogenesis. Despite its relevant functions, the underlying cellular mechanisms involved in SYMRK signaling activity remain poorly characterized. In this study, we demonstrated that *PvSYMRK-EGFP* undergoes constitutive and rhizobia-induced endocytosis. We found that in uninoculated roots, *PvSYMRK-EGFP* is mainly associated with the plasma membrane, although intracellular puncta labelled with *PvSymRK-EGFP* were also observed in root hair and nonhair-epidermal cells. Inoculation with *Rhizobium etli* producing Nod factors induces in the root hair a redistribution of *PvSYMRK-EGFP* from the plasma membrane to intracellular puncta. In accordance, deletion of the endocytic motif YXXØ (YKTL) and treatment with the endocytosis inhibitors ikarugamycin (IKA) and tyrphostin A23 (TyrA23), as well as brefeldin A (BFA), drastically reduced the density of intracellular *PvSYMRK-EGFP* puncta. A similar effect was observed in the phosphorylation-deficient (T589A) and kinase-dead (K618E) mutants of *PvSYMRK-EGFP*, implying these structural features are positive regulators of *PvSYMRK-EGFP* endocytosis. Our findings lead us to postulate that rhizobia-induced endocytosis of SYMRK modulates the duration and amplitude of the SYMRK-dependent signaling pathway.

Keywords Brefeldin A · *Phaseolus vulgaris* · Root hair · Symbiosis · SYMRK · Tyrphostin A23 · YXXØ

Abbreviations

BR11 BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
CME Clathrin-mediated endocytosis

FLS2 FLAGELLIN SENSING 2
IKA Ikarugamycin
IT Infection thread
KD Kinase-dead mutant
PM Plasma membrane
RLK Receptor-like kinase
SYMRK Symbiosis receptor-like kinase

Communicated by Dorothea Bartels.

✉ Rosana Sánchez-López
rosana.sanchez@ibt.unam.mx

Raúl Dávila-Delgado
raul.davila@ibt.unam.mx

Karen Flores-Canul
flores_kanul@live.com.mx

Marco Adán Juárez-Verdayes
relf125@hotmail.com

¹ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Introduction

Over the past 20 years, much effort has been expended in identifying genes involved in plant-microbe interactions (Roy et al. 2020). A feature that soon became evident is the role played by a battery of genes, such as *SYMRK/DMI2/NORK*, *CASTOR*, *POLLUX*, *DELLA*, *CYCLOPS*, among others, as essential components of a common symbiotic signaling pathway (CSSP) involved in plant-mycorrhizal,

non-legume-actinobacteria and legume-rhizobia symbiotic interactions (Yang et al. 2022). Although genetics and molecular studies provided insights into the functional role of CSSP genes and the molecular mechanisms regulating their signaling activity, our current understanding of the cellular processes that mediate their functions is still limited (Roy et al. 2020).

Symbiosis Receptor-like Kinase gene, also known as *SYMRK* in *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus* and *Arachis hypogaea*, *DMI2* in *Medicago truncatula* or *NORK* in *M. sativa*, hereafter named *SYMRK*, is a plant-specific plasma membrane (PM) leucine-rich repeat (LRR) receptor-like kinase gene essential for both fungal and bacterial symbiosis. However, SYMRK functions have been more extensively described in the legume-rhizobia interaction (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002; Markmann et al. 2008; Kosuta et al. 2011; Roy et al. 2020).

Legume nodulation is characterized by the development of a new organ in the root, the nitrogen-fixing nodule, where the bacteria reduce atmospheric nitrogen and provide assimilable nitrogen metabolites for the plant growth, while the legume supplies di-carbon compounds, as an energy source for rhizobia (Roy et al. 2020). The nodule development, a well-coordinated process, is initiated by the mutual sensing of molecular signals secreted by the root (flavonoids) and the rhizobia (lipochito-oligosaccharides named Nod factors), which are specifically recognized by the bacterial transcriptional activator NodD and plant-specific LysM receptor-like kinases (*L. japonicus* NFR1/NFR5 or *M. truncatula* NFP/LYK3), respectively (Roy et al. 2020). It has been established that growing root hairs with typical cytoplasmic streaming in the subapical region are those potentially competent to respond to rhizobia inoculation or Nod factors treatment (Sieberer and Emons 2000). Nod-factor perception triggers molecular and cellular responses, such as the activation of SYMRK, signal transduction cascades, actin cytoskeleton rearrangements, root apical swelling and expression of the common symbiotic signaling pathway (CSSP) genes, among others, all of them required for the setting up of the epidermal infection and cortical cell division (Oldroyd and Downie 2008; Yang et al. 2022). Further, rhizobia get trapped in a groove formed in the curled root hair, creating an infection chamber. At this point, the root hair cell wall and PM invaginate, forming a unique tubular structure, known as the infection thread (IT), through which rhizobia enter the root and invade the cortex. In parallel, the cortical cells re-activate their cell cycle to form a nodule primordium, which progressively differentiates into a mature nodule. Finally, rhizobia are progressively “delivered” from the IT into cells at the central zone of the nodule, within a quasi-organelle structure known as a symbiosome, in which the rhizobia differentiate into N_2 -fixing bacteroids (Oldroyd and Downie 2008). *symrk* mutants show

a root hair curling-deficient response upon rhizobia inoculation, but root hair swelling, and branching responses were observed. Therefore, epidermal infection and cortical cell division are impaired; accordingly, no nodules are formed (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002; Esseling et al. 2004). Interestingly, the nodulation deficient phenotype of *symrk* mutants is fully restored by the Eurosid versions of SYMRK (*Datisca glomerata* and *Tropaeolum majus*), but it is not by the shorter versions of SYMRK from the non-nodulating eudicots *Papaver rhoeas*, *Solanum lycopersicum* (formerly *Lycopersicon esculentum*) and the monocots *Oryza sativa* and *Zea mays* (Markmann et al. 2008). A deeper understanding of SYMRK functions in legume-rhizobia symbiosis was achieved using *Sesbania rastrata*, *P. vulgaris* and *M. truncatula* transgenic roots expressing a SYMRK-specific RNAi. SYMRK downregulated roots generate scarce, small, non-infected nodule-like structures (pseudo-nodules) that present abundant wide ITs and an inefficient release of bacteria from the IT. Consequently, the nodule cells are poorly infected and symbiosomes are absent, as confirmed by transmission electron microscopy analysis (Capoen et al. 2005; Limpens et al. 2005; Sánchez-López et al. 2011). In addition, SYMRK-silencing affects the vascular bundle development, as we have previously described for *P. vulgaris* nodulation (Sánchez-López et al. 2011). The SYMRK-silencing phenotype correlates with the spatio-temporal expression pattern of SYMRK in the epidermis of uninoculated roots. Additionally, in rhizobia-inoculated roots, the expression of SYMRK is detected in the cortical zone in front of the infection site, as well as in the nodule primordium and the central zone of the nodule (Bersoult et al. 2005; Capoen et al. 2005; Limpens et al. 2005; Sánchez-López et al. 2011; Den Herder et al. 2012). Interestingly, PvSYMRK has been immunodetected associated with uninfected cells interspersed in the central tissue of *P. vulgaris* mature nodules, as well as with the nodule vasculature and root central cylinder (Sánchez-López et al. 2011). Together, these data indicate that SYMRK is a key regulator of both infection and nodule organogenesis, opening the question of how SYMRK signaling is transduced in such a diversity of cells expressing the receptor. Some relevant answers were also obtained using biochemical and molecular biology strategies (Yoshida and Parniske 2005; Markmann et al. 2008; Antolín-Llovera et al. 2014a; Saha et al. 2014) which outlined how to approach the cell biology of SYMRK.

Legume SYMRK genes encode for polypeptides of 919–926 residues, with a highly conserved sequence that contains a signal peptide sequence, an ectodomain consisting of a malectin-like domain (MLD) linked by a GDPC motif to three LRRs, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic kinase domain (Markmann et al. 2008). The function of the ectodomain has not been established, but it seems to be related to SYMRK degradation-mediated signaling and

protein–protein interactions, likely with *LjNFR5* (Antolín-Llovera et al. 2014a, b; Li et al. 2018). Substitution of the Pro residue in the GPC motif by a leucine, as in the *Ljsymrk-14* mutant (Kosuta et al. 2011), appears to abolish a proteolytic release of the malectin-like domain (MLD) fragment and impairs the epidermal infection process, although cortical and nodule primordium infection are apparently unaffected (Kosuta et al. 2011; Antolín-Llovera et al. 2014a; Li et al. 2018). Additionally, the overexpression of the SYMRK cytoplasmic kinase domain induces spontaneous nodulation in the absence of rhizobia (Saha et al. 2014). Biochemical studies on the SYMRK kinase activity and phosphorylation status (“phospho-code”) have been focused on specific motifs, as well as on Ser/Thr residues and the Tyr gatekeeper. In vitro phosphorylation assays, using the *E. coli*-expressed SYMRK intracellular domain, reveal that the individually mutated residues *LjSYMRK* T593A and *LjSYMRK* T760A (*A. hypogaea* SYMRK T763A), as well as the gatekeeper Tyr (*AhSYMRK* Y670F/A/E) lead to a significantly reduced autophosphorylation and kinase activities. Moreover, the nodulation *minus* phenotype of *M. truncatula* TR25, a *dmi2* null mutant, is partially restored by *AhSYMRK* (Y670F/A). Abnormal ITs are formed, but their progression is arrested at the epidermal-cortical interface, although empty nodules are eventually generated (Saha et al. 2016). Hence, the activation of SYMRK is phosphorylation-dependent (Yoshida and Parniske 2005; Samad-dar et al. 2013; Saha et al. 2016). Additionally, substituting the catalytic Lys residue in the conserved phosphotransfer VAVK motif (K622 in *LjSYMRK*) for a Glu residue leads to a loss of kinase activity, meaning *LjSYMRK* K612E is a kinase-dead (KD) mutant (Yoshida and Parniske 2005; Saha et al. 2014).

Regarding SYMRK subcellular localization, Riely et al. (2013) reported that, in the native root hair cell environment, DMI2-GFP is mainly associated with the PM. In contrast, a significant number of DMI2-GFP-labeled “cytoplasmic organelles” are detected upon Nod factors treatment. However, no additional evidence has been further described. In the infection zone of *M. truncatula* nodules, DMI2-GFP seems to be associated with the host cell PM and the membrane surrounding the IT (Limpens et al. 2005).

Of particular interest are three E3 ubiquitin ligase genes (*LjSIE3*, *LjSINA4* and *MiPUB2*) involved in nodulation, which were identified as potential interactors of the intracellular region of SYMRK (Den Herder et al. 2012; Liu et al. 2018). E3 ubiquitin ligase-mediated ubiquitination of PM proteins is a signal that triggers their endocytosis and, eventually, sorting for degradation (Schwihla and Korbei 2020). Additionally, confocal images of *Nicotiana benthamiana* leaf cells co-expressing *LjSYMRK* and *LjSINA4DN* have revealed the colocalization and redistribution of both proteins from the PM to dots at the cytosolic interface with

the PM (Den Herder et al. 2012). Therefore, it is plausible to consider that SYMRK ubiquitination and further endocytosis are involved in downstream signaling cascade at early stages of nodulation. Several groups have evoked this hypothesis; however, it has not been formally addressed.

Inspired by the current understanding of the relevant role of endocytic steps in the signaling activity of other plant receptor-like kinases (RLKs), such as FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) and BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BR11), and the auxin transporters PIN (Antolín-Llovera et al. 2014b; Claus et al. 2018), in this study we investigated whether *PvSYMRK* undergoes endocytosis. We analyzed the effect of endocytosis-specific inhibitors and site-directed mutagenesis on the subcellular distribution of *PvSYMRK-EGFP* in nonhair-epidermal cells and in rhizobia-responsive root hairs. Our data demonstrate that rhizobia induce the endocytosis of SYMRK in root hairs at early stages of the epidermal infection.

Materials and methods

Plants and bacteria growth conditions

Phaseolus vulgaris cv. Negro Jamapa (common bean) seeds were obtained from local farmers in Morelos, Mexico. Seeds were surface-sterilized with 70% alcohol (1 min) and 20% commercial chlorine (5 min). The germination was carried out in a sterile tray on an absorbent paper moistened with liquid Fåhræus medium, at 28 °C for 48 h in the dark. Composite plants with transgenic roots were generated by *A. rhizogenes* K599-mediated transformation, as described by Sánchez-López et al. (2011). Transgenic roots (fluorescent roots) were identified by direct observation of hairy roots under an epifluorescence stereomicroscope (SXZ7, Olympus) looking for the expression of LifeAct-mTurquoise2, as a fluorescent transgenic marker. Non-fluorescent roots were eliminated to favor the growth of transgenic roots. Transgenic roots were allowed to recover for two days in liquid Fåhræus medium. Subsequently, composite plants were used for confocal microscopy analysis or transferred to pots containing vermiculite to further be inoculated with either *Rhizobium tropici* CIAT899 GUS (Vinueza et al. 2003), *R. etli* CE3 pMP604 (Dávila-Delgado et al. 2020) or *R. etli* CFNX89 (a CE3 derivative strain cured of the symbiotic plasmid, pSym, therefore it does not produce Nod factors; Brom et al. 1992; Corvera et al. 1999) diluted in 10 mM MgSO₄ to an OD₆₀₀ of 0.05. Plants were grown in a greenhouse with controlled environment conditions (28 °C, 16 h/8 h photoperiod) and watered with nitrogen-free Fåhræus medium and harvested at the indicated time points. *Agrobacterium rhizogenes* K599 was grown in LB medium supplemented with 200 µg/ml spectinomycin.

Rhizobia strains were grown in PY medium supplemented with 7 mM CaCl₂ and 100 µg ml⁻¹ streptomycin, 100 µg/ml spectinomycin (*R. tropici* CIAT899 GUS), 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 5 µg ml⁻¹ tetracycline (*R. etli* CE3 pMP604) or 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid (*R. etli* CFNX89).

Plasmid constructions

In all cases, PCR amplified fragments were first cloned into the pENTR™/D-TOPO® entry vector (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) to further be subcloned in the suitable plant expression vector by recombination using Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen).

All cloning steps were performed in *E. coli* DH5a, confirmed by sequencing, and final constructs were electroporated into *A. rhizogenes* K599. The primer information is listed in Table S1.

pBGWFS7-pSYMRK

A 1622 bp fragment upstream *SYMRK* start codon was amplified by genomic PCR using the primers pPvSYMRKH5' UP (which adds a *Hind*III restriction site at the 5' end of the PCR product) and pPvSYMRK3' LW and subcloned by recombination in the plant vector pBGWFS7 in order to generate the transcriptional fusion pPvSYMRK::GFP-GUS.

pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquoise2

This plasmid was constructed in three steps: (i) to generate the cassette p35S::LifeAct-mTurquoise2, a chimeric cDNA coding for LifeAct-mTurquoise2 (772 pb) was PCR amplified from plasmid mTurquoise2 using the primers LifeAct LUP, which comprises 51 nucleotides coding for the actin-binding domain, known as LifeAct (Vidali et al. 2009), in frame with 15 nucleotides of the 5' end of the mTurquoise2 coding sequence, and the primer mTurquoise2 LW. LifeAct-mTurquoise2 cDNA was subcloned by recombination into the vector pK2GW7 to generate the transcriptional fusion p35S::LifeAct-mTurquoise2 (pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2). (ii) To construct the cassette pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP (5152 bp; Fig. S1a), *PvSYMRK* cDNA was PCR amplified from total cDNA *P. vulgaris* roots using the primers 5UTR UP and PvSYMRK LW and cloned by recombination into the plasmid pH7FWG2, creating the cassette p35S::PvSYMRK-EGFP-T35S. A *Hind*III restriction site located at 171 pb upstream to *PvSYMRK* start codon (Fig. S1a) was advantageous to substitute the promoter 35S for the *Hind*III fragment from the cassette pPvSYMRK::GFP-GUS to generate the plasmid

pH7FWG2-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP. This plasmid was the template for a PCR reaction using the pair of primers MauBIpPvSYMRK UP and T35S_SacI; the PCR product (5,425 bp) was cloned into pENTR™/D-TOPO™ (Invitrogen), generating pENTR-MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI. (iii) To construct the plasmid pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquoise2, the plasmid pENTR-MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI was digested with *Mau*BI and *Sac*I restriction enzymes and the released fragment was cloned in the corresponding restriction sites in pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2, giving rise to pK2GW7-pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-p35S::LifeAct-mTurquoise2.

Site-directed mutagenesis

Mutant versions of *PvSYMRK-EGFP* were generated using QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), a pair of specific mutagenic primers (Table S1) and pENTR-MauBI_pPvSYMRK::PvSYMRK-EGFP-T35S_SacI, as template. The mutant versions were cloned in the vector pK2GW7-LifeAct-mTurquoise2, as described above.

Whole-mount protocol and pharmacological treatments

The composite plants were placed in a modified Petri dish, as described by Monroy-Morales et al. (2022). Briefly, transgenic roots were whole-mounted in the chamber/cover slip containing 2–3 ml of liquid Fåhræus medium and covered with a transparent sheet of cellulose (sweet cellophane) plain or with 6 mm diameter holes made manually, as indicated. Untreated roots were immediately examined under the microscope. Before proceeding to treatments, roots were allowed to get adapted to these conditions for 24 h at 28 °C and 16 h/8 h photoperiod. Epidermal sections of the differentiation zone of transgenic roots were selected by confocal microscopy, and inhibitors were directly administered through a hole in the cellulose sheet. Images were acquired at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min *post*-incubation with the inhibitor. Inhibitors were used at 100 µM brefeldin A (BFA), 50 µM cycloheximide (CHX), 20 µM ikarugamycin (IKA), 50 µM tyrphostin A23 (TyrA23) and 50 µM tyrphostin 51 (Tyr51).

Confocal fluorescence imaging

Images were captured as multiple Z-planes, each one with 0.70–0.77 µm in thickness and a laser exposure time of 300–400 ms using a 3I Marianas confocal Spinning Disk Microscope (Zeiss Observer Z.1 inverted type; Intelligent Imaging Innovations Ltd, UK), with either a water- or oil-immersion × 40 objectives (0.75 and 1.3 N.A., respectively)

with an Andor Ixon 3 EMCCD camera, model DU-897E-CS0-#BV (Andor Technology, Belfast, UK) controlled by SlideBook6 (Digital Microscopy Software; Intelligent Imaging Innovations Ltd, London, UK). EGFP and mTurquoise2 were excited at 488 and 445 nm, respectively, and fluorescence emission was collected at 507 nm for EGFP and 474 nm for mTurquoise2.

Quantitative evaluation of puncta in nonhair-epidermal cells and image processing

Quantification of fluorescent puncta in confocal fluorescence images was performed using original files without any processing or editing. From each set of confocal image stacks, three independent cells co-expressing *PvSYM*RK-EGFP and LifeAct-mTurquoise2 were segmented and the corresponding stacks were transformed to a 2D image using the Z-project tool of ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Further the perimeter of the cell was delimited with the Straight tool and the fluorescent intracellular puncta (minute rounded dots) were quantified using Find Maxima tool. The area of each segmented cell was estimated using the Polygon Selection tool and values considered as the cell area. To facilitate the visualization of fluorescent puncta in images presented in figures, representative images were processed using deconvolution in 3D spatial dimensions performed with the Parallel Iterative Deconvolution plugin of ImageJ, using the WLP method and Wiener Filter gamma with the following parameters: weiner=0.001, maximum number of iterations=100, terminate=0.01 (if mean delta is less than this value) and precision=double. This methodology requires a normalized point spread function (PSF), which was created with the Diffraction PSF 3D plugin of ImageJ using the following parameters: index of refraction of the mounting media=1.3 or 1.5 and NA=0.75 or 1.3, when using water- or oil-immersion objectives, respectively; wavelength=507 nm for EGFP, 474 nm for mTurquoise2; width=64 pixels and height=64 pixels. Deconvolved images were edited with basic tool of ImageJ adjusting brightness and contrast and adding pseudo-color.

GUS activity

Hairy roots bearing the cassette *pPvSYM*RK:*GUS-GFP* were dissected and GUS activity was detected, as described Monroy-Morales et al (2022). Briefly, roots were immersed successively for 5 min at room temperature in washing solution I (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, and 0.5 mM potassium ferrocyanide), washing solution II (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.5 mM potassium ferricyanide, 2 mM EDTA- Na_2 and 0.1% Triton X 100) and substrate solution (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.5 mM potassium ferricyanide, 2 mM EDTA- Na_2 , 0.1% Triton X 100

and 0.5 mM 3-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) at 37 °C until a blue precipitate appeared (usually 30–60 min). Roots were cleared in 1% commercial chlorine for 16 h and mounted in 30% glycerol-2% DMSO. Images were captured in a stereomicroscope SZX7 (Olympus) coupled to a QImaging MicroPublisher Color RTV-5.0 CCD Camera controlled by Image ProPlus 7.0 software.

Statistical analyses

To validate the quantitative analysis and confirm the reproducibility of the results, statistical analysis of data from series of biological replicates were performed using GraphPad Prism version 6. The difference between values from incubation times in time-course experiments were evaluated using One-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test or Friedman test, as indicated. *P* values were indicated in figure legends.

Results

Spatio-temporal analysis of *PvSYM*RK promoter activity in *Phaseolus vulgaris* transgenic roots

According to several reports, full complementation of *sym*rK mutants is only achieved when *SYM*RK expression is driven by the endogenous promoter (Limpen et al. 2005; Markmann et al. 2008; Riely et al. 2013). Thus, we first analyzed the cell-specific activity of the 1622 bp fragment upstream *PvSYM*RK start codon, here referred the promoter of *PvSYM*RK (*pPvSYM*RK). As shown in Fig. S2, in uninoculated *P. vulgaris* transgenic roots, *pPvSYM*RK was active in tip-growing and mature root hair cells and nonhair-epidermal cells (Fig. S2a–e). The promoter activity was also detected in pericycle cells of the root differentiation zone and during the development of a lateral root primordium (Fig. S2a–c). In rhizobia-inoculated roots, *pPvSYM*RK activity was observed in curled root hair cells and proliferating cells underneath the infection site (Fig. S2f), as well as in those forming a nodule primordium (Fig. S2c, d), which is consistent with the activity of *MiD*M2 promoter (Bersoult et al. 2005; Riely et al. 2013). In the mature nodule, the activity of *pPvSYM*RK was also distinguished in uninfected cells in the central tissue and the vascular bundles (Fig. S2e–i). A similar spatio-temporal pattern was reported in a previous study on the immunolocalization of *PvSYM*RK in *P. vulgaris* nodulation (Sánchez-López et al. 2011).

Redistribution of *PvSYM*RK-EGFP in *Phaseolus vulgaris* root hair cells responsive to rhizobia-inoculation

Before assessing the effect of rhizobia-inoculation on the subcellular distribution of *PvSYM*RK-EGFP in *P. vulgaris*

root hair cells, we first established a protocol to distinguish root hairs that are responding to rhizobia (hereafter responsive root hairs) from non-responsive root hair cells, based on the typical actin-cytoskeleton rearrangements observed in the root hair in response to Nod factors treatment or rhizobia inoculation (Sieberer and Emons 2000; Timmers 2008; Yokota et al. 2009). We took advantage of the actin-binding properties of the fluorescent F-actin reporter LifeAct-mTurquoise2, co-expressed with *PvSYMRK-EGFP* in the transgenic roots. Non-responsive root hair cells looked the same as root hair cells from uninoculated roots, meaning they had the typical cytoplasmic streaming in the subapical region of the root hair. They also presented fine bundles of actin filaments labelled with LifeAct-mTurquoise2, that extended along the root hair and reached the apical tip (Fig. S3), as previously described (Sieberer and Emons 2000; Timmers 2008; Yokota et al. 2009). Whereas in inoculated roots, root hair cells responsive to *R. etli* CE3 pMP604 were identified by the swelling of the root hair tip and the apical accumulation of LifeAct-mTurquoise2 signal that resembles the typical accumulation of fragmented actin filaments (actin-cytoskeleton rearrangements) at the apical/subapical zone of the root hair tip in response to rhizobia and Nod factors treatment (Fig. S3; Timmers 2008; Yokota et al. 2009). Both changes precede SYMRK activation and downstream signaling, as previously described (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002; Kosuta et al. 2011).

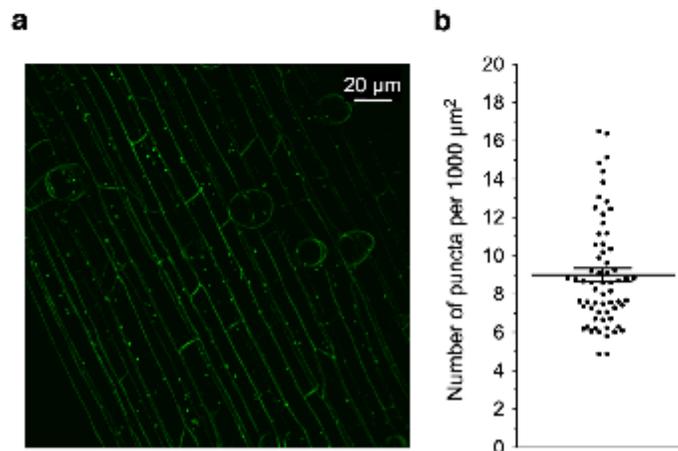
Regarding its subcellular distribution in uninoculated root hair cells, *PvSYMRK-EGFP* fluorescent signal was detected associated with the root hair PM in a discrete dotted pattern that seems homogeneously distributed (Fig. S3), as it has been reported for *MtDMI2* (Riely et al. 2013). Occasionally, one or two *PvSYMRK-EGFP* labeled puncta were observed

in the root hair cytoplasm. In contrast, in responsive root hair cells from *R. etli* CE3 pMP604-inoculated roots, *PvSYMRK-EGFP* fluorescent signal disappeared from the root hair PM, and a significantly higher number of *PvSYMRK-EGFP*-containing puncta was observed (Fig. S3). We confirmed that non-responsive root hair cells expressing *PvSYMRK-EGFP*, adjacent to the assessed responsive root hair cells, did not present more than one fluorescent puncta (Fig. S3). Our results were consistent with the inducing effect of Nod factors on the distribution of *MtDMI2-GFP* at the apical PM, and the presence of fluorescent dot-like structures described as "cytoplasmic organelles" in *M. truncatula* root hairs (Riely et al. 2013). In nonhair-epidermal cells, next to growing root hair cells in uninoculated roots, *PvSYMRK-EGFP* is also associated with the PM and intracellular puncta (Fig. 1), although fluorescent puncta are notoriously more abundant than in root hairs. Collectively, our data provide strong evidence that points to an active redistribution of *PvSYMRK-EGFP* from the PM to intracellular puncta in *P. vulgaris* root epidermal cells and opens the possibility that abundance of *PvSYMRK* at the PM of root hairs responsive to rhizobia could be mediated by endocytosis, as it has been described for other plant receptors (Robatzek et al. 2006; Geldner et al. 2007).

Pharmacological treatment affects the abundance of *PvSYMRK-EGFP* labeled puncta in nonhair-epidermal cells

To reinforce such a hypothesis, we assessed the effect of specific inhibitors on the density of *PvSYMRK-EGFP*-containing puncta in nonhair-epidermal cells, as they are less sensitive to mechanical actions than root hair cells (Esseling

Fig. 1 Quantitative evaluation of the puncta containing *PvSYMRK-EGFP* in nonhair-epidermal cells from *Phaseolus vulgaris* transgenic roots. **a** Number of fluorescent puncta was assessed in 2D images of cells from uninoculated *P. vulgaris* transgenic roots expressing *PvSYMRK-EGFP*. **b** Number of puncta are normalized per 1000 μm^2 of nonhair-epidermal cell area. Mean value = 9 ± 0.3 SE, $n = 64$ cells from 29 independent transgenic roots. Bars correspond to mean value \pm SE



et al. 2004). As a first step, we determined that these cells have an average of 9.0 (± 0.3 SE) fluorescent puncta per 1000 μm^2 (Fig. 1). Therefore, nonhair-epidermal cells are a suitable model for performing a comparative analysis of the density of *PvSYM*RG-EGFP-containing puncta.

In nonhair-epidermal cells treated with the inhibitor of protein synthesis cycloheximide (CHX), a significant reduction in the percentage of fluorescent puncta was observed after 30–40 min of treatment (54 and 44%, respectively). The lowest relative value (36%) was reached at the 50–60 min time points (Fig. 2a). Hence, two fluorescent puncta populations appear to be present in nonhair-epidermal cells: a large CHX-sensitive group, involved in the transport of newly synthesized *PvSYM*RG-EGFP, and a small group of CHX-resistant puncta, that may correspond to puncta enriched in *PvSYM*RG-EGFP, which may transit between the PM and the TGN/EE (*trans*-Golgi network/early endosome), a plant compartment that merges secretory and endocytic/recycling pathways (Lam et al. 2009).

To assess whether the intracellular *PvSYM*RG-EGFP-labeled puncta arise from endocytosis, nonhair-epidermal cells were treated with the inhibitors IKA and tyrphostin

A23 (TyrA23), specifics of clathrin-mediated endocytosis (CME). Both inhibitors display a blocking effect on the endocytic mechanism, with no interference from subcellular trafficking activity (Dhonukshe et al. 2007). Even though the use of IKA to study the endocytic activity in plant cells is not as extensive as in animal cells, it has been established that IKA blocks the maturation and/or pinching-off of clathrin-coated vesicles from the plant PM without affecting internal vesicle trafficking (Onelli et al. 2008; Elkin et al. 2016). TyrA23, an inhibitor broadly used to prove the endocytosis of PM cargoes, disrupts CME by blocking the interaction between the $\mu 2$ subunit of the endocytic sorting adaptor AP2 complex and a PM protein cargo (Kleine-Vehn et al. 2011; Beck et al. 2012; Irani et al. 2012). We found that treatment of nonhair-epidermal cells with IKA or TyrA23 led to a gradual decrease in the number of *PvSYM*RG-EGFP-containing puncta. Approximately 40–50% reduction was reached after 20–30 min of treatment with IKA or TyrA23 (Fig. 2b, c), attaining the lowest values at the 60 min time point (32 and 27%, respectively). In contrast, no effect was observed when the nonhair-epidermal cells were treated with 50 μM Tyr51 (Fig. 2c), a structural analog of TyrA23 that is

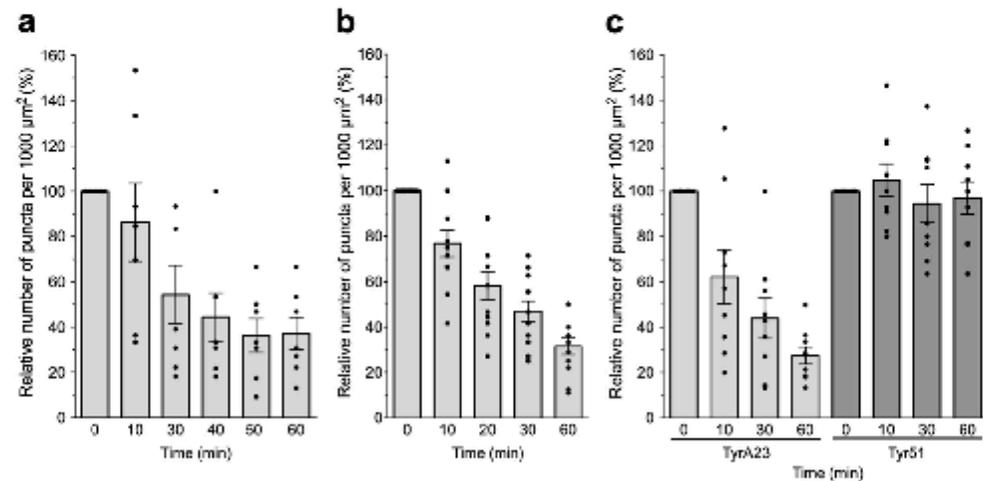


Fig. 2 The density of puncta containing *PvSYM*RG-EGFP is reduced in nonhair-epidermal cells treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide, CHX (a) or the endocytosis inhibitors ikarugamycin, IKA (b) and tyrphostin A23, TyrA23 (c). Tyrphostin 51 (Tyr51), a structural analog of TyrA23 that does not interfere with endocytosis, was used as a negative control (c). Treatments were performed using 50 μM CHX, 20 μM IKA, 50 μM TyrA23 or 50 μM Tyr51. Time-lapse confocal images from *Phaseolus vulgaris* transgenic root expressing *PvSYM*RG-EGFP were captured at the indicated time points. The effect of each inhibitor in individual nonhair-epidermal cells is plotted as the percentage (%) of the relative number of puncta

per 1000 μm^2 at each time point (*t*), respect to *t*=0 (100%). Mean values of the number of puncta per 1000 μm^2 of cell area (\pm SE) at *t*=0 are as follows: CHX, 7.72 \pm 0.68, *n*=7; IKA, 7.74 \pm 0.69, *n*=12; TyrA23, 7.94 \pm 0.48, *n*=10; Tyr51, 12.28 \pm 0.99, *n*=9. Data are from three to four plants from independent experiments. Bars indicate mean values \pm SE. *n*=number of root hairs analyzed. One-way ANOVA analysis of variance on ranks and multiple comparisons (Tukey's method) showed statistical difference at *P*<0.001, except for data from Tyr51 treatment (*P*=0.37). Friedman test analysis confirmed that differences in data from TyrA23 and Tyr51 treatments are statistically significant (*P*<0.0001)

broadly used as a negative control since it does not interfere with endocytosis (Dhonukshe et al. 2007).

To provide further insights into that direction, we also investigated the inhibitory effect of the fungal toxin brefeldin A (BFA). In plant cells, BFA inhibits the exocytic vesicle trafficking *post*-TGN/EE and the endosomal recycling process without affecting the endocytic activity. Thus, it became a valuable tool for investigating the endocytosis of plant receptors (Lam et al. 2009). A notable feature of BFA treatment is the coalescence of vesicles in transit between the TGN/EE and the PM, which gives rise to large subcellular structures known as BFA-induced compartments (Lam et al. 2009). *PvSYMRK*-EGFP-containing puncta progressively disappeared in nonhair-epidermal cells treated with BFA (Fig. 3). After 20–30 min of treatment with BFA, the number of puncta was approximately halved (40–60%). At 60 min of treatment, the percentage was reduced to 27% (Fig. 3a). As expected, subcellular structures that resemble BFA-induced compartments were detected at 30–60 min

time points of BFA treatment (Fig. 3b). These results are consistent with the dynamics reported in *Arabidopsis thaliana* root cells treated with this inhibitor, where BFA-induced compartments were observed after approximately 30 min of treatment (Geldner et al. 2007; Irani et al. 2012; Liu et al. 2020). As shown, the inhibitory effects of BFA, IKA and TyrA23 strongly support the notion of a constitutive CME in nonhair-epidermal cells. It is relevant to note that the PM pool of *PvSYMRK*-EGFP was not affected by the treatment with inhibitors (Fig. S4), which may reflect a low *PvSYMRK*-EGFP turnover.

T589, K618 and the tetrapeptide YKTL are involved in the endocytosis of *PvSYMRK*-EGFP

To provide additional support to our findings, we investigated the presence of a TyrA23-targeting endocytic sorting motif YXX Φ in *PvSYMRK*. Typically, the lineal motif YXX Φ is located at the cytosolic domain of transmembrane

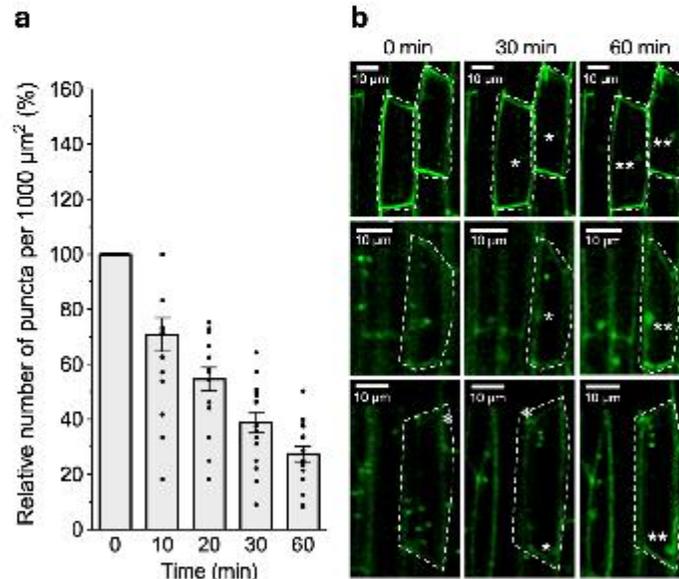


Fig. 3 *PvSYMRK*-EGFP accumulates in brefeldin A (BFA)-induced compartments in *Phaseolus vulgaris* nonhair-epidermal root cells. Time-lapse confocal images of root epidermal cells treated with BFA were captured at the indicated time points. **a** Effect of BFA on the relative number of puncta per 1000 μm^2 of nonhair-epidermal cell (%) was determined as indicated in Fig. 2. Mean value of the number of puncta per 1000 μm^2 of cell area (\pm SE) at $t=0$ was 10.84 ± 0.93 , $n=17$ cells, from six plants from independent experiments. **b** Representative images of four independent nonhair-epidermal cells treated

with BFA are showed (delimited by a dashed line). Images were captured at the indicated time points. The number of *PvSYMRK*-EGFP-containing puncta progressively disappeared, giving rise to BFA-induced compartments enriched in *PvSYMRK*-EGFP, which become apparent at time points $t=30$ and the $t=60$ (indicated with one or two asterisks, respectively). Bars indicate mean values \pm SE. One-way ANOVA analysis of variance on ranks and multiple comparisons (Tukey's method) showed statistical difference at $P < 0.0001$

proteins that undergo endocytosis (Banbury et al. 2003; Robatzek et al. 2006; Liu et al. 2020). As a putative endocytic YXXØ motif, we identified the tetrapeptide YKTL located at the intracellular juxtamembrane region (JXM) of SYMRK in legumes (Fig. S1). The sequence YKTL is followed by a well-conserved Ile residue and the ATP-binding site of domain I in the kinase domain (Fig. S1b). Since phospho-code of residues at or near the YXXØ motif seems to be a relevant feature in the endocytosis of plant receptors (Robatzek et al. 2006; Geldner et al. 2007; Gruszka 2013), we also identified the highly conserved T589 and T756 residues in PvSYMRK, equivalent to phosphorylation sites T593 and T760 involved in the phosphorylation-dependent activation of *Lj*SYMRK (Yoshida and Parniske 2005). Those threonine residues are located at two residues from the tetrapeptide YKTL, and in the activation loop, respectively (Fig. S1). In addition, considering that phosphomimetic mutants *Lj*SYMRK K622E and *Ah*SYMRK K625E are inactive kinases (kinase-dead, KD), frequently used as negative controls in SYMRK studies (Yoshida and Parniske 2005; Samaddar et al. 2013; Saha et al. 2016; Bhattacharya et al. 2019), we also mapped the corresponding Lys residue in PvSYMRK (K618; Fig. S1). To explore their structure–function relationship in PvSYMRK-EGFP endocytosis, we generated mutants by individual site-directed substitution of residues T589 and T756 by Ala (non-phosphorylatable), K618 by Glu, or the deletion of the tetrapeptide YKTL. Transgenic roots expressing mutated versions of PvSYMRK-EGFP were generated, except for PvSYMRK(T756A)-EGFP. In this case, no transgenic roots developed even when 15 independent clones of *A. rhizogenes* carrying one of two independently constructed expression cassettes were tested.

The analysis of transgenic roots expressing PvSYMRK(T589A)-EGFP showed a significant reduction in the number of intracellular fluorescent puncta in nonhair-epidermal cells (Fig. 4). We also found a significant blockage of PvSYMRK(K618E)-EGFP KD endocytosis, which is equivalent to less than 25% of the internalization activity of PvSYMRK-EGFP (Fig. 4). Together, our data allow us to propose that T589-dependent phosphorylation and PvSYMRK kinase activity are positive regulators of PvSYMRK endocytosis.

Additionally, we observed that endocytosis of PvSYMRK(ΔYKTL)-EGFP was also drastically diminished to 44% (Fig. 4), which provides strong evidence that the tetrapeptide YKTL is a functional endocytic sorting motif and strengthens our data on the inhibitory effect of TyrA23 on the endocytosis of PvSYMRK-EGFP. Our conclusion is consistent with studies on the functional characterization of YXXØ motifs present in cytosolic segments of several plant RLKs, RLPs (LRR receptor-like proteins), PRRs (pattern-responsive receptor), and auxin- and mineral nutrient transporters (Zipfel and Oldroyd 2017).

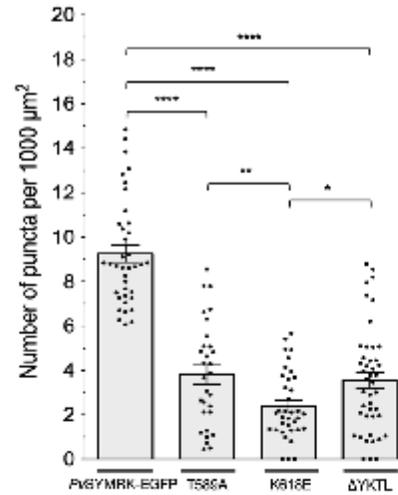


Fig. 4 T589A, K618E and ΔYKTL mutations impair the constitutive endocytosis of PvSYMRK-EGFP in *Phaseolus vulgaris* nonhair-epidermal root cells. T589 and YKTL are conserved residues present in the intracellular juxtamembrane region (JXM) of SYMRK/DMI2 orthologues (Fig. S1). Phospho-code of T589 regulates the kinase activity of SYMRK, and tetrapeptide YKTL is an endocytic linear motif YXXØ. K618 is part of the conserved phosphotransfer VAVK motif and required for SYMRK kinase activity. Phosphomimetic mutations, such as K618E inactivate the SYMRK/DMI2 kinase activity (kinase-dead, KD mutation). Positions are indicated in Fig. S1. Mean average values of the number of puncta per 1000 μm² of cell area (± SE) are as follows: PvSYMRK-EGFP, 9.25 ± 0.38, n = 39; T589A, PvSYMRK(T589A)-EGFP, 3.8 ± 0.43, n = 30; K618E, PvSYMRK(K618E)-EGFP, 2.4 ± 0.25, n = 36; ΔYKTL, PvSYMRK(ΔYKTL)-EGFP, 3.6 ± 0.36, n = 44. Values are from three to six plants from independent experiments. Bars are mean values ± SE. n = number of root hairs analyzed. One-way ANOVA analysis of variance on ranks and multiple comparisons (Tukey's method) showed statistical difference at P < 0.0001 (****), P < 0.01 (**), P < 0.05 (*)

Rhizobium etli-induced endocytosis of PvSYMRK-EGFP in Phaseolus vulgaris root hair cells is Nod factors-dependent and requires the YXXØ motif and an active kinase

To better characterize the rhizobia-induced endocytic activity of PvSYMRK-EGFP observed in Fig. S3, we analyzed the subcellular distribution in root hairs from roots inoculated with *R. etli* CFNX89, a rhizobia strain that does not produce Nod factors (Brom et al. 1992; Corvera et al. 1999). We found that *R. etli* CFNX89 inoculation did not induce a redistribution of PvSYMRK-EGFP, it remains mainly associated with the root hair PM, suggesting that Nod factors are involved in the induced endocytosis of PvSYMRK-EGFP

(Fig. 5a, b). We also observed that root hairs presented a rearranged actin-cytoskeleton (Fig. 5a), an unexpected result considering that such rearrangement typically occurs in response to exposure to exogenous Nod factors or with rhizobia strains competent in the synthesis and secretion of active Nod factors (Sieber and Emmons 2000; Timmers 2008; Yakota et al. 2009; Liang et al. 2021). Interestingly, actin-related proteins are differentially expressed in roots inoculated with wild-type rhizobia and an exopolysaccharide-deficient (*exoY*) rhizobia mutant (Jones et al. 2008).

To functionally test the role of YKTL and K618 in the induced endocytic activity of *PvSYMRK*-EGFP, we performed a quantitative analysis of the subcellular distribution of unmutated *PvSYMRK*(Δ YKTL)-EGFP and *PvSYMRK*(K618E)-EGFP KD in root hair cells in the context of uninoculated and *R. etli* CE3 pMP604-inoculated *P. vulgaris* transgenic roots. Consistently, only unmutated *PvSYMRK*-EGFP undergoes induced endocytosis in root hair cells actively responding to *R. etli* CE3 pMP604 (Fig. 5). Deletion of the tetrapeptide YKTL and K618E mutation

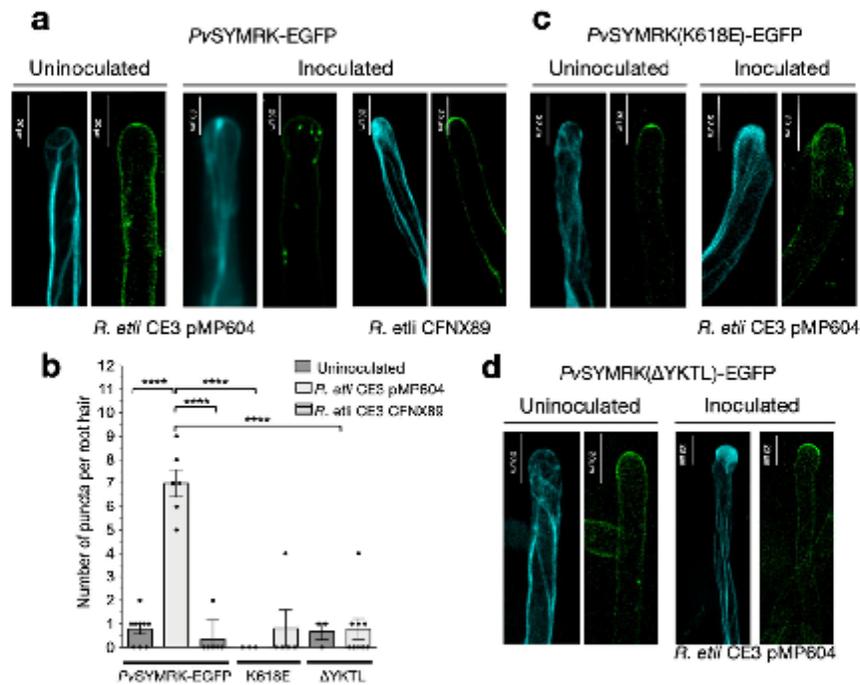


Fig. 5 *PvSYMRK*-EGFP endocytosis is induced in rhizobia-responsive root hair cells from *Phaseolus vulgaris* transgenic roots and it depends on Nod factors, the YXXØ motif and a fully-active kinase. **a–d** In *P. vulgaris* roots inoculated with either *Rhizobium etli* CE3 pMP604 (a Nod factors *plus* strain) or *R. etli* CE3 CFNX89 (a Nod factors minus strain; Brom et al. 1992; Corvera et al. 1999) (3dpi), responsive root hair cells are distinguished from the non-responsive root hair cells by the accumulation of LifeAct-mTurquoise2 signal (in cyan) at the apical zone, as described in Fig. 2. In root hair cells from uninoculated roots, unmutated and mutated *PvSYMRK*-EGFP (all in green) are mainly associated with the apical PM and eventually one or two intracellular puncta are observed (**a–d**). In responsive-root hair cells from inoculated roots with *R. etli* CE3 pMP604, a higher number of unmutated *PvSYMRK*-EGFP-labeled puncta are found (**a, b**), whereas no significant effect is observed in root hairs from roots

inoculated with the rhizobia Nod factors minus strain (CFNX89) (**a, b**), indicating that rhizobia-induced endocytosis of *PvSYMRK*-EGFP depends on the presence of Nod factors. Neither *PvSYMRK*(K618E)-EGFP nor *PvSYMRK*(Δ YKTL)-EGFP undergo endocytosis in responsive-root hairs from roots inoculated with *R. etli* CE3 pMP604 (**b–d**). The average in number of puncta \pm SE rhizobia-responsive root hair cells, are as follows: unmutated *PvSYMRK*-EGFP from roots uninoculated or inoculated with *R. etli* CE3 pMP604 or *R. etli* CE3 CFNX89), 0.78 ± 0.22 , $n=9$, 7 ± 0.6 , $n=6$ and 0.33 ± 0.3 , $n=6$, respectively; *PvSYMRK*(K618E)-EGFP, 0 puncta, $n=3$ and 0.8 ± 0.8 , $n=5$, respectively; *PvSYMRK*(Δ YKTL)-EGFP, 0.67 ± 0.33 , $n=3$ and 0.78 ± 0.43 , respectively. Values and bars are mean values \pm SE, n =number of root hairs cells analyzed. One-way ANOVA analysis of variance on ranks and multiple comparisons showed statistical difference (Tukey's method) at $P < 0.0001$ (****)

entailed a detrimental effect on the induced endocytic activity of PvSYMRK-EGFP in root hair cells (Fig. 5).

Discussion

SYMRK/DMI2/NORK is a root-specific RLK that plays an essential role in plant–microbe symbiotic interactions (Markmann et al. 2008). Collective data from molecular, biochemical, genetics and microscopical analysis revealed that activation of SYMRK triggers a signal transduction cascade that regulates an extensive signaling network associated with infection and nodule organogenesis (Yang et al. 2022). However, despite its relevant functions in nodulation, the cellular processes linking SYMRK activation to downstream cellular mechanisms underlying SYMRK signaling remain to be uncovered. The key questions are what is the identity of the extracellular elicitor(s) or ligand that activates SYMRK and what is the functional connection between intracellular SYMRK interactors, such as *LjSIE3*, *LjSINA4* and *MtPUB* (Den Herder et al. 2012; Liu et al. 2018), among others, and SYMRK activation. The identification of suppressor mutants of the SYMRK-deficient phenotype would also be a valuable tool.

To provide insights into the cellular mechanisms involved in SYMRK regulation, we applied a different approach, the visualization of the subcellular dynamics of SYMRK in the root hair in response to rhizobia. Since root hair phenotype of *M. truncatula* and *L. japonicus dmi2/symrk* mutants have not been fully addressed, we performed our analysis in *P. vulgaris* transgenic roots expressing the cassette pPvSYM Δ K::PvSYM Δ K-EGFP in a wild-type background. We did not find a significant difference in the expression of PvSYM Δ K and other common symbiotic signaling pathway (CSSP) genes in the transgenic roots respect to *P. vulgaris* wild-type roots. We demonstrated that rhizobia induce PvSYM Δ K-EGFP endocytosis in *P. vulgaris* root hair cells. Whereas in epidermal cells from uninoculated roots, the endocytosis of PvSYM Δ K-EGFP is constitutive. In addition, we provide insights into the role played by the T589 phospho-code, the K618-dependent kinase activity, and the linear motif YKTL, as positive regulators of the endocytic activity of this receptor.

We first focused on describing the subcellular distribution of PvSYM Δ K in *P. vulgaris* root epidermal cells. We found that PvSYM Δ K-EGFP associates with the apical PM and intracellular puncta in root hair cells and nonhair-epidermal cells (Fig. 1 and S3). We also observed that inoculation with rhizobia induce a redistribution of PvSYM Δ K-EGFP in responsive root hair cells, meaning it disappears from the PM and intracellular puncta become more abundant in root hairs that present fragmented actin filaments in the apical zone (Fig. S3). MDMI2-GFP presented a similar pattern

in *M. truncatula* root hair cells treated with Nod factors (Riely et al. 2013), suggesting that clearance of SYMRK from the apical PM of rhizobia-responsive root hair cells is a cellular mechanism that contributes to the homeostasis of this receptor at early stages of epidermal infection in legume:rhizobia nodulation. It is tempting to hypothesize that endocytosis SYMRK is a cellular mechanism common in plant symbiosis.

The functional relationship between a dual distribution of plant PM-associated RLKs and endocytosis was demonstrated by studying the activity of BR11, FLS2, BOR1 and PIN proteins. Further studies led to the identification of coreceptors, inhibitory proteins and other regulators associated with plant receptor endocytosis (Robatzek et al. 2006; Dhonukshe et al. 2007; Geldner et al. 2007; Kleine-Vehn et al. 2011; Beck et al. 2012; Irani et al. 2012; Liu et al. 2020).

To support the hypothesis on the endocytic activity of PvSYM Δ K-EGFP, we considered it imperative to document the effect of endocytosis inhibitors on PvSYM Δ K-EGFP subcellular distribution, as well as the role played by specific residues present in PvSYM Δ K. We found that the treatment with IKA or TyrA23, disruptors of CME (Onelli et al. 2008; Elkin et al. 2016), and the deletion of the tetrapeptide YXX Φ (PvSYM Δ K(Δ YKTL)-EGFP; Figs. 2, 4 and 5) have a detrimental effect on the number of intracellular puncta bearing PvSYM Δ K-EGFP, which indicate that PvSYM Δ K-EGFP undergoes CME. The motif YXX Φ is the target of TyrA23 and the binding site for the μ 2 subunit of the endocytic sorting AP2 complex of CME (Kadlecova et al. 2017). The driving force of the YXX Φ motif in CME was originally described in mammalian cells (Banbury et al. 2003). Soon, it became evident that it has a similar function in plant CME. Site-directed mutations of YXX Φ impair CME of *LeEix2* (Bar and Avni 2009), *OsNAS2* (rice PM nicotianamine synthase; Nozoye et al. 2014) and BR11 (Liu et al. 2020). Moreover, the motif YXX Φ has been associated with events that connect endocytosis and polar localization of BOR1 (Takano et al. 2010) and PIN proteins (Glanc et al. 2018).

We also showed that in brefeldin A (BFA)-treated cells, PvSYM Δ K-EGFP accumulates in subcellular structures that resemble BFA-induced compartments (Fig. 3). Therefore, homeostasis of PvSYM Δ K-EGFP at the PM of epidermal cells may involve an endosomal-recycling step, as it is the case of BR11, FLS2, BOR1, PIN1/PIN2, and FERONIA (Robatzek et al. 2006; Geldner et al. 2007; Dhonukshe et al. 2007; Lam et al. 2009; Kleine-Vehn et al. 2011; Beck et al. 2012; Irani et al. 2012; Liu et al. 2020).

Additionally, we found that non-phosphorylatable T589A mutation compromises the endocytosis of PvSYM Δ K-EGFP (Fig. 4). T593, equivalent to PvSYM Δ K T589, is critical for the phosphorylation-dependent activation of *LjSYM* (Yoshida and Parniske 2005). Therefore, it is plausible that

efficient endocytosis of PvSYMRK-EGFP depends on the phospho-code of T589. The phosphorylation status of specific Thr or Ser residues, located at the intracellular juxtamembrane region (JXM) region, is relevant for the endocytosis of the boron importer *AtNIP5;1* (Thr in the TPG repeats; Takano et al. 2010; Bertoni 2017) and the metal transporter *AtNRAMP* (Ser20; Castaignes et al. 2021). Whether the phospho-code of BRI T842 and T872 (Wang et al. 2005; Oh et al. 2012), FLS2 T867 (Robatzek et al. 2006) and XA21 T680 and T705 (Chen et al. 2010) are related to their endocytic activity is an issue that remains to be explored.

Interestingly, kinase-dead mutation K618E prevents PvSYMRK-EGFP endocytosis (Figs. 4 and 5), which denotes a functional relationship between a fully active receptor and endocytosis. Although such a relationship has not been directly addressed in other plant RLKs that undergo endocytosis, the inhibitory effect of kinase-dead mutants on the corresponding signaling pathway offers insights to be considered. For instance, using BRI1(K911E) KD, it became evident that BRI1 kinase activity is crucial for BRI1 ubiquitination, a critical step in BRI1 endocytosis (Liu et al. 2020). Moreover, functional interaction between BRI1 and its coreceptor BAK1 is defective in plants expressing either BRI1 KD or BAK1 KD (Wang et al. 2005). In contrast, BAK1 kinase activity is not required for flg22-induced formation of a FLS2-BAK1 KD complex, but it blocks the activation of downstream signaling (Schulze et al. 2010).

Currently, induced endocytosis of a PM-associated RLK is described as a cellular process involved in a specific step of molecular communication between the outside and the inside of the cell. In this case, endocytosis is usually induced by the binding of an RLK-specific external ligand or elicitor, which triggers either the activation or the inhibition of the respective RLK-dependent downstream signaling pathway (Claus et al. 2018). It is, therefore, reasonable to postulate that rhizobia-induced endocytosis of SYMRK modulates the duration and amplitude of the SYMRK-dependent signaling pathway, essential for the epidermal infection. In that regard, identification of the molecular signals that trigger this endocytic step is crucial. Our results provide some clues in that direction. We found that the rhizobia-induced endocytosis of PvSYMRK-EGFP appears to be dependent on Nod factors, as it is not induced in root hairs responsive to a Nod factor-deficient strain (*R. etli* CFNX89, Fig. 5). An unexpected result was the actin-cytoskeleton rearrangements induced in root hairs *R. etli* CFNX89, meaning in absence of Nod factors, which contrast with our current understanding that indicates that such rearrangements are in response to the exposure of exogenous Nod factors (Sieberer and Emmons 2000; Timmers 2008; Yakota et al. 2009; Liang et al. 2021). Notwithstanding the specific response to Nod factors treatment, the possibility that an unknown

bioactive signal, different from Nod factors may also be involved in the induced cytoskeleton rearrangements. An intriguing option that has not been explored is whether exopolysaccharides (EPS) and lipopolysaccharides (LPS) synthesized by rhizobia (Jones et al. 2008; Maillet et al. 2020; Acosta-Jurado et al. 2021) are elicitors of the actin-depolymerization activity leading to actin cytoskeleton rearrangements in response to rhizobia inoculation, as it has been found associated with plant immunity responses (Zipfel and Oldroyd 2017; Sassmann et al. 2018; Wang et al. 2022).

Undoubtedly, the availability of receptor-specific ligands has been decisive in identifying coreceptors and inhibitors, as well as in deciphering the dynamics of the induced endocytosis of BRI1, FLS2, CERK, BOR1, LeEix2, among others (Claus et al. 2018; Mao and Li 2020).

Regarding the identity of a putative SYMRK coreceptor, according to Antolín-Llovera et al. (2014b) in rhizobia-inoculated *L. japonicus* roots, *LjSYMRK* forms a heterodimer with the Nod factors coreceptor *LjNFR5*. Such an interaction seems to be mediated by the *LjSYMRK* LRRs, whereas in uninoculated roots, the *LjSYMRK* malectin-like domain impedes *LjSYMRK-LjNFR5* interaction and promotes *LjSYMRK* degradation (Antolín-Llovera et al. 2014b). Additionally, an unexpected functional relationship between SYMRK and BAK1, involved in rhizobial suppression of plant immune response, has recently been reported (Feng et al. 2021). BAK1/SERK3 is a versatile coreceptor that forms heterodimers with diverse RLKs, such as BRI1, FLS2, EFR, BIR1, PEPR1/PEPR2, among others (Chinchilla et al. 2009). Thus, BAK1 is a central player in processes associated with plant hormone regulation, development, programmed cell death and immune responses (Gao et al. 2019; Mao and Li 2020). On the other hand, our current understanding indicates that rhizobia signaling occurs through MAMP (microbe-associated molecular pattern) elicitors that transiently activate a plant immune response, also termed MTI (MAMP-triggered immunity), and Nod factors, essential for an optimal epidermal infection. Interestingly, it also seems that Nod factors are involved in suppressing plant immune response (Antolín-Llovera et al. 2014a; Cao et al. 2017; Yang et al. 2022). Therefore, a balance between immune response and symbiosis appears to be determinant for the setting of the initial steps of rhizobia infection. According to Feng et al. (2021), the MTI induced in *L. japonicus* roots treated with the flg22 elicitor is suppressed by a rhizobia-induced SYMRK-BAK1 interaction. Furthermore, *ljbak1*-deficient CRISPR-Cas9 mutants display a higher number of infection events than in wild-type roots, even though the nodule density in both group of plants was comparable (Feng et al. 2021). Therefore, the final balance of the crosstalk between BAK1 and SYMRK would be that BAK1, a

negative regulator of rhizobial infection, is inhibited by SYMRK, allowing the infection and nodulation to take place (Feng et al. 2021).

Future challenges in the study of SYMRK will be focused on deciphering the functional and cellular relationship between SYMRK activation, rhizobia-induced endocytosis, downstream signaling and BAK1-interaction associated with the immune response and the infection processes at the initial stages of nodulation, and eventually in the nonhair-epidermal infection during mycorrhizal and actinorhizal symbiosis.

Author contribution statement RDD designed the experiments and conducted the cloning and confocal microscopy experiments and image analysis. KFC and MAJV conducted the promoter cloning and GUS staining analysis; RSL designed and supervised the study. RDD and RSL wrote the manuscript. All authors read and approved the submitted version of the manuscript.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04116-0>.

Acknowledgements This manuscript is based primarily on Raúl Dávila-Delgado PhD thesis, he is a doctoral student from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank M.Sc. Andrés M. Saralegui Amaro and Dr. J. Arturo Pimentel Cabrera members of the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, UNAM (IBT-UNAM) for their excellent technical assistance in confocal microscopy. M.Sc. Eugenio López Bustos, M.Sc. Jorge Arturo Yañez Ponce de León and Dr. Ruben Paul Gaytan Colín (Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBT-UNAM). We also thank Shirley E. Ainsworth for library services (Unidad de Biblioteca, IBT-UNAM), M.T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, Ing. Roberto P. Rodríguez Bahena, L.J. Jesús Omar Arriaga Pérez, and M.C. Arturo Ocaídiz Ramírez for computer services (Unidad de Cómputo, IBT-UNAM). *R. etli* CFNX89 was kindly provided by Dr. David Romero and Laura Cervantes de la Luz, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Plasmid mTurquoise2 was kindly provided by Dr. Takuya Nishigaki Shimizu (IBT-UNAM). We gratefully acknowledge Adán Oswaldo Guerrero Cardenas for his technical advice in image processing. We are grateful to Enrique Merino Pérez (IBT-UNAM) for critical reading of the manuscript. The participation of Noreide Nava Núñez and Oliva Santana Estrada (IBT-UNAM) at the initial stage of this project is gratefully acknowledged.

Funding This work was partially supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM (PAPIIT/UNAM IN207215, IN206118 and IN204721) to RSL and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) with PhD fellowship R.D.-D. (288601) and post-doctoral fellowship to MAJV (CVU 174751).

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Acosta-Jurado S, Fuentes-Romero F, Ruiz-Sainz JE, Janczarek M, Vinardell JM (2021) Rhizobial exopolysaccharides: genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes. *Int J Mol Sci* 22(12):6233. <https://doi.org/10.3390/ijms22126233>
- Antolín-Llovera M, Petutsching EK, Ried MK, Lipka V, Nürnberger T, Robatzek S, Parniske M (2014a) Knowing your friends and foes—plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis or defence. *New Phytol* 204:791–802. <https://doi.org/10.1111/nph.13117>
- Antolín-Llovera M, Ried MK, Parniske M (2014b) Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with nod factor receptor 5. *Curr Biol* 24(4):422–427. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.053>
- Banbury DN, Oakley JD, Sessions RB, Banling G (2003) Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 278:12022–12028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211966200>
- Bar M, Avni A (2009) EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant J* 59:600–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03897.x>
- Beck M, Zhou J, Faulkner C, MacLean D, Robatzek S (2012) Spatiotemporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting. *Plant Cell* 24(10):4205–4219. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100263>
- Bersault A, Camut S, Perhald A, Kereszt A, Kiss G, Cullimore J (2005) Expression of the *Medicago truncatula* *DMI2* gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 18:869–876. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0869>
- Bertoni G (2017) Threonine phosphorylation regulates polar localization of the boric acid transporter NIP5;1 in root cells. *Plant Cell* 29(4):605. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00233>
- Bhattacharya A, Paul A, Chakrabarti D, DasGupta M (2019) Gate-keeper-activation loop cross-talk determines distinct autoactivation states of symbiosis receptor kinase. *Biochemistry* 58:2418–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00071>
- Brom S, de los Santos AG, Stepkowsky T, Flores M, Dávila G, Romero D, Palacios R (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli are required for optimal symbiotic

- performance. *J Bacteriol* 174(16):5183–5189. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5183-5189.1992>
- Cao Y, Halane MK, Gassmann W, Stacey G (2017) The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 68:535–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-arpla-042916-041030>
- Capoen W, Goormachtig S, De Rycke R, Schorreyers K, Holsters M (2005) SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10369–10374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504250102>
- Castains L, Alcon C, Kosuth T, Correia D, Curie C (2021) Manganese triggers phosphorylation-mediated endocytosis of the Arabidopsis metal transporter NRAMPL. *Plant J* 106(5):1328–1337. <https://doi.org/10.1111/tpj.15239>
- Chen X, Chern M, Canlas PE, Jiang C, Ruan D, Cao P, Ronald PC (2010) A conserved threonine residue in the juxtamembrane domain of the XA21 pattern recognition receptor is critical for kinase autophosphorylation and XA21-mediated immunity. *J Biol Chem* 285(14):10454–10463. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.093427>
- Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* 14(10):535–541. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.002>
- Claus LAN, Sabatin DV, Russinova E (2018) The crossroads of receptor-mediated signaling and endocytosis in plants. *J Integr Plant Biol* 60(9):827–840. <https://doi.org/10.1111/jipb.12672>
- Corvera A, Promé D, Promé JC, Martínez-Romero E, Romero D (1999) The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol Plant Microbe Interact* 12(3):236–246. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.236>
- Dávila-Delgado R, Bañuelos-Vázquez LA, Monroy-Morales E, Sánchez-López R (2020) *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604: a useful biological tool to study initial infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation. *Planta* 252:69. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03479-y>
- Den Herder G, Yoshida S, Antolín-Llovera M, Ried MK, Parniske M (2012) *Lotus japonicus* E3 ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection. *Plant Cell* 24:1691–1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082248>
- Dhonukshe P, Añiento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* 17:520–527. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.052>
- Elkin SR, Oswald NW, Reed DK, Mettlen M, MacMillan JB, Schmid SL (2016) Ikarugamycin: a natural product inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 17:1139–1149. <https://doi.org/10.1111/tra.12425>
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihalea S, Kaló P, Gyögy B (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–966. <https://doi.org/10.1038/nature00842>
- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC (2004) A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in NORK-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. *Plant Cell* 16:933–944. <https://doi.org/10.1105/tpc.019653>
- Feng Y, Wu P, Liu C, Peng L, Wang T, Wang C, Tan Q, Li B, Ou Y, Zhu H, Yuan S, Huang R, Stacey G, Zhang Z, Cao Y (2021) Suppression of LjBAK1-mediated immunity by SymRK promotes rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Mol Plant* 14(11):1935–1950. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.07.016>
- Gao X, Ruan X, Sun Y, Wang X, Feng B (2019) BAKing up to survive a battle: functional dynamics of BAK1 in plant programmed cell death. *Front Plant Sci* 9:1913. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01913>
- Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BR11. *Genes Dev* 21(13):1598–1602. <https://doi.org/10.1101/gad.1561307>
- Glanc M, Fendrych M, Friml J (2018) Mechanistic framework for cell-intrinsic re-establishment of PIN2 polarity after cell division. *Nat Plants* 4:1082–1088. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0318-3>
- Gruszka D (2013) Brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *Int J Mol Sci* 14:8740–8774. <https://doi.org/10.3390/ijms14058740>
- Irani NG, Di Rubbo S, Mylle E et al (2012) Fluorescent castasterone reveals BR11 signaling from the plasma membrane. *Nat Chem Biol* 8(6):583–589. <https://doi.org/10.1038/nchembio.958>
- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, Vandenbosch KA, Walker GC (2008) Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(2):704–709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709338105>
- Kadlecova Z, Spielman SJ, Loecker D, Mohanakrishnan A, Reed DK, Schmid SL (2017) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *J Cell Biol* 216(1):167–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A et al (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* 7:540. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.72>
- Kosuta S, Held M, Hossain MS, Morieri G, Macgillivray A, Johansen C, Antolín-Llovera M, Parniske M, Oldroyd GE, Downie AJ (2011) *Lotus japonicus* symRK-14 uncouples the cortical and epidermal symbiotic program. *Plant J* 67:929–940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04645.x>
- Lam SK, Cai Y, Tse YC, Wang J, Law AH, Pimpl P, Chan HY, Xia J, Jiang L (2009) BFA-induced compartments of the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells. *Plant J* 60(5):865–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.04007.x>
- Li H, Chen M, Duan L, Zhang T, Cao Y, Zhang Z (2018) Domain swap approach reveals the critical roles of different domains of SYMRK in root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Front Plant Sci* 9:697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00697>
- Liang P, Schmitz C, Lacey B, Diteengou FA, Su C, Schulze E, Knerer J, Grosse R, Keller J, Libourel C, Delaux PM, Ott T (2021) Formin-mediated bridging of cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*. *Curr Biol* 31(12):2712–2719.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.002>
- Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Geurts R (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10375–10380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504284102>
- Liu J, Deng J, Zhu F, Li Y, Lu Z, Qin P, Wang T, Dong J (2018) The MtDMI2-MtPUB2 negative feedback loop plays a role in nodulation homeostasis. *Plant Physiol* 176(4):3003–3026. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01587>
- Liu D, Kumar R, Claus LAN et al (2020) Endocytosis of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is partly driven by a canonical tyrosine-based motif. *Plant Cell* 32:3598–3612. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00384>
- Luo Y, Russinova E (2017) Quantitative microscopic analysis of plasma membrane receptor dynamics in living plant cells. *Methods Mol Biol* 1564:121–132. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6813-8_10
- Maillet F, Fournier J, Mendis HC, Tadege M, Wen J, Ratet P, Mysore KS, Gough C, Jones KM (2020) *Sinorhizobium meliloti* succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate

- independently in symbiotic infection. *Plant J* 102(2):311–326. <https://doi.org/10.1111/tj.14625>
- Mao J, Li J (2020) Regulation of three key kinases of brassinosteroid signaling pathway. *Int J Mol Sci* 21(12):4340. <https://doi.org/10.3390/ijms21124340>
- Markmann K, Giczey G, Parniske M (2008) Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol* 6:497–506. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060068>
- Monroy-Morales E, Dávila-Delgado R, Ayala-Guzmán E, Gamboa-deBuen A, Sánchez-López R (2022) Visualization of the crossroads between a nascent infection thread and the first cell division event in *Phaseolus vulgaris* nodulation. *Int J Mol Sci* 23(9):5267. <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>
- Nozoye T, Nagasaka S, Bashir K, Takahashi M, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa N (2014) Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXØ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *Plant J* 77:246–260. <https://doi.org/10.1111/tj.12383>
- Oh MH, Clouse SD, Huber SC (2012) Tyrosine phosphorylation of the BR11 receptor kinase occurs via a post-translational modification and is activated by the juxtamembrane domain. *Front Plant Sci* 3:175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00175>
- Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Onelli E, Prescianotto-Baschong C, Caccianiga M, Moscatelli A (2008) Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *J Exp Bot* 59(11):3051–3068. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern154>
- Riely BK, Larraínzar E, Haney CH et al (2013) Development of tools for the biochemical characterization of the symbiotic receptor-like kinase DM12. *Mol Plant Microbe Interact* 26(2):216–226. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-11-0276>
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20:537–542. <https://doi.org/10.1101/gad.366506>
- Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R, Udvardi MK (2020) Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 32(1):15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Saha S, Dutta A, Bhattacharya A, DasGupta M (2014) Intracellular catalytic domain of symbiosis receptor kinase hyperactivates spontaneous nodulation in absence of rhizobia. *Plant Physiol* 166:1699–1708. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250084>
- Saha S, Paul A, Herring L, Dutta A, Bhattacharya A, Samaddar S, Goshe MB, DasGupta M (2016) Gatekeeper tyrosine phosphorylation of SYMRK is essential for synchronizing the epidermal and cortical responses in root nodule symbiosis. *Plant Physiol* 171:71–81. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01962>
- Samaddar S, Dutta A, Sinharoy S, Paul A, Bhattacharya A, Saha S, Chien KY, Goshe MB, DasGupta M (2013) Autophosphorylation of gatekeeper tyrosine by symbiosis receptor kinase. *FEBS Lett* 587:2972–2979. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.050>
- Sánchez-López R, Jáimegui D, Nava N, Alvarado-Affantranger X, Montiel J, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2011) Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ* 34:2109–2121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02408.x>
- Sassmann S, Rodrigues C, Milne SW, Nenninger A, Allwood E, Littlejohn GR, Talbot NJ, Soeller C, Davies B, Hussey PJ, Deeks MJ (2018) An immune-responsive cytoskeletal-plasma membrane feedback loop in plants. *Curr Biol* 28(13):2136–2144.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.014>
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem* 285(13):9444–9451. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.096842>
- Schwila M, Korbei B (2020) The beginning of the end: initial steps in the degradation of plasma membrane proteins. *Front Plant Sci* 11:680. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00680>
- Sieberer B, Emons AMC (2000) Cytoskeleton and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* 214:118–127. <https://doi.org/10.1007/BF02524268>
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S et al (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417:959–962. <https://doi.org/10.1038/nature00841>
- Takano T, Tanaka M, Toyoda A, Miwa K, Kasai K, Fuji K, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T (2010) Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(11):5220–5225. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910744107>
- Timmers AC (2008) The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J Microsc* 231(2):247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02040.x>
- Vidal I, Rounds CM, Hepler PK, Bezanilla M (2009) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One* 4(5):e5744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005744>
- Vinuesa P, Neumann-Silkow F, Pacios-Bras C, Spaink HP, Martínez-Romero E, Werner D (2003) Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact* 16(2):159–168. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.159>
- Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* 17:1685–1703. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031393>
- Wang J, Lian N, Zhang Y, Man Y, Chen L, Yang H, Lin J, Jing Y (2022) The cytoskeleton in plant immunity: dynamics, regulation, and function. *Int J Mol Sci* 23(24):15553. <https://doi.org/10.3390/ijms232415553>
- Yang J, Lan L, Jin Y, Yu N, Wang D, Wang E (2022) Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *J Integr Plant Biol* 64(2):244–267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Yokota K, Fukui E, Madsen LH et al (2009) Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* 21:267–284. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063693>
- Yoshida S, Parniske M (2005) Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 280:9203–9209. <https://doi.org/10.1074/jbc.m411665200>
- Zipfel C, Oldroyd GE (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543(7645):328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation

Elizabeth Monroy-Morales ¹, Raúl Dávila-Delgado ¹, Emmanuel Ayala-Guzmán ¹, Alicia Gamboa-deBuen ² and Rosana Sánchez-López ^{1,*}

- ¹ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamulpa, Cuernavaca 62210, México; elizabeth.monroy@ibt.unam.mx (E.M.-M.); raul.davila@ibt.unam.mx (R.D.-D.); tepoz_penta@hotmail.com (E.A.-G.)
- ² Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; agamboa@ecologia.unam.mx
- * Correspondence: rosana.sanchez@ibt.unam.mx; Tel: +52-7773291600 (ext. 38121)

Abstract: The development of a symbiotic nitrogen-fixing nodule in legumes involves infection and organogenesis. Infection begins when rhizobia enter a root hair through an inward structure, the infection thread (IT), which guides the bacteria towards the cortical tissue. Concurrently, organogenesis takes place by inducing cortical cell division (CCD) at the infection site. Genetic analysis showed that both events are well-coordinated; however, the dynamics connecting them remain to be elucidated. To visualize the crossroads between IT and CCD, we benefited from the fact that, in *Phaseolus vulgaris* nodulation, where the first division occurs in subepidermal cortical cells located underneath the infection site, we traced a *Rhizobium etli* strain expressing DsRed, the plant cytokinesis marker YFP-ProKNOLLE, a nuclear stain and cell wall auto-fluorescence. We found that the IT exits the root hair to penetrate an underlying subepidermal cortical (S-E) cell when it is concluding cytokinesis.

Keywords: cell division; cell plate; cytokinesis; infection thread; nodulation; nucleus; *Phaseolus vulgaris*; rhizobia; KNOLLE



Citation: Monroy-Morales, E.; Dávila-Delgado, R.; Ayala-Guzmán, E.; Gamboa-deBuen, A.; Sánchez-López, R. Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5267. <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>

Academic Editor:
Ioannis-Dimitrios Adamakis

Received: 24 March 2022
Accepted: 3 May 2022
Published: 9 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cell division is crucial for the legume-rhizobia nodulation, a symbiotic process characterized by the development of a new lateral organ on the plant root, an N₂-fixing nodule. Nodules are composed of the peripheral tissue, which includes the vascular system and the central tissue or infected zone, where the nitrogen reduction takes place. Two types of nodules exist, indeterminate and determinate [1,2]. Indeterminate nodules are developed in the legumes *Medicago truncatula*, *M. sativa* and *Pisum sativum*, among others, and are defined by an oval shape and a long-lived or persistent meristem, in which the initial cortical cell division (CCD) takes place in the inner most cortical and pericycle cells opposite the protoxylem poles [3]. The mature nodule presents a central tissue organized in gradient zones (I, meristematic; II, invasion zone; III, fixation zone; IV, senescent zone; and V, saprophytic zone [2]). In contrast, determinate nodules, formed in *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Lotus japonicus*, have a round shape and present limited mitotic activity; in *P. vulgaris*, CCD begins in the outermost C1 cortical cell [4], whereas in *L. japonicus*, it corresponds to cell layer C3 [4]. The central tissue is a mixture of infected and uninfected cells [2,5].

It is noteworthy that, irrespective of their origin and tissue organization, both nodule types share a basic developmental program that comprises two linked and tightly regulated processes: infection and organogenesis [6,7]. Epidermal infection is triggered by the exchange of molecular signals, namely, root flavonoids and rhizobial lipochito-oligosaccharides (Nod factors, NF). The NF signal is decoded in the root hair when the NF

are perceived by specific LysM receptor-like kinases, which in turn activates a signaling cascade [6,8]. The responsive root hair curls, trapping the rhizobia in an infection chamber, where bacteria form a microcolony. At this site, the cell wall and plasma membrane invaginate to form an inward, transcellular tunnel-like structure, known as infection thread (IT), which mediates the entry and proliferation of rhizobia [9,10]. The IT growth is anticlinal to the root surface and presents branching episodes. Eventually, the IT elongates and exits the root hair to infect the root cortical zone to invade the neighboring cells. Concomitant to the IT development, cortical cells become mitotically active. Initial CCDs are always anticlinal. An active cell proliferation gives rise to a nodule primordium. The peripheral post-meristematic cells differentiate to form the nodule cortex and the pro-vascular traces. At the young nodule stage, IT invades the central zone to further release the bacteria into the intracellular environment, the symbiosome [1,2]. In this membrane-bound *quasi*-organelle, rhizobia differentiate into bacteroids that express the nitrogenase complex, responsible for the reduction of molecular nitrogen (N₂) to supply the legume with bioavailable nitrogen. In contrast, the rhizobia obtain di-carbon compounds, as energy source [11].

Certainly, nodulation is a complex process that recruits part of the lateral root formation and the plant hormone regulatory programs [8,12–18], as it was revealed by the identification of genes essential for the development of the IT and nodule primordium, as well as by the nodule organogenesis. For the characterization of a variety of legume mutants deficient in nodulation, the phenotypic analysis of gene-specific downregulation/overexpression and transcriptomic analysis have contributed significantly to our current understanding of the IT initiation and progression processes, alongside the cell cycle reactivation in cortical cells at the pole of infection [5,8,16,18–20]. The list of genes related to the IT formation process includes receptor-like kinases (NFR5/NFR1/NFP/LYK3 and SYMRK/DMI2/NORK; [21–25]), small GTPases (e.g., ROP3, ROP6, ROP10 and RabA2; [26–31]), endocytosis and exocytosis markers (e.g., CHC and VAMP721e [27,32]), cell wall enzymes (e.g., Pectate-Lyase [33]), cytoskeletal proteins (e.g., flotillin, components of SCAR/WAVE and SCARN [34–40]), E3 ubiquitin ligases (e.g., CERBERUS, SINA and PUB [41–43]), transcription factors (e.g., NSP1/NSP2, ERF, ERN1, CYCLOPS/IPD3, NF-Y family members and NIN, a key regulator of the nodulation process [6,44–51]). Interestingly, some of those transcription factors are part of a complex transcriptional network that regulates both epidermal and cortical infection, and promotes nodule organogenesis, i.e., NIN, NSP1 and NSP2, as well as AP2/ERF [32,40,49,52,53]. CCD at early stages of nodulation is controlled by genes related to the cell cycle regulatory machinery and those associated to hormone signaling programs [14,19,20,53–62]. The first insights into this direction were obtained from early experiments assessing the mitogenic effect of NF on uninoculated alfalfa roots. Inner CCDs were observed in treated roots, and in situ hybridization confirmed the induced expression of cyclin B (*cyc2*) and cyclin-dependent kinase 2 (*cdc2*) [63]. Similar results were observed by Roudier et al. [59], when characterizing the gene *Medsa;cycA2;2*. In the same line, CCD was induced when a pea root-cortex explant was treated with auxin and cytokinin [64]. Moreover, the auxin responsiveness in rhizobium-induced cell division was confirmed by tracing the activity of auxin-responsive promoters (using *GH3::GUS*, *DR5::GUS* or *DR5::GFP* reporters), which were detected at the first division event at the inner or the outer cortex of *P. sativum* or *L. japonicus* infected roots, respectively [58,65]. Further reports corroborated that auxin efflux and influx, auxin transport inhibitors, auxin response factors and microRNA160 play a central role in rhizobial infection, cell cycle control and differentiation of vascular tissue in the nodulation process [17,19,59,66]. The phenotypic characterization of the *L. japonicus* gain-of-function and loss-of-function mutants *arf2/lhk1* and *hit1* and *M. truncatula* CRE1-RNAi roots [60,62,67] paved the way for deciphering the functions of the cytokinin signaling pathway, which includes genes involved in the biosynthesis and degradation of cytokinin, the participation of responsive regulators and transcription (reviewed in [16]), as part of the network controlling nodulation.

Notwithstanding the relevance of the molecular mechanisms discussed above, the cellular relationship between infection and CCD has yet to be established. It is also important to keep in mind that the nodule organogenesis begins with the onset of a new meristem, which implies that progenitor cortical and pericycle cells transit from a differentiated state towards the acquisition of a proliferative competence, a process that remains to be fully elucidated. Moreover, to invade the nodule primordium cells, the IT must advance through undivided cortical cells, which should have previously adjusted their physiology and cellular functions, as it has been described in *M. truncatula* and *L. japonicus* nodulation, where the first division events occur in cells located at three to five layers away from the epidermal infection. In contrast, nodulation in *P. vulgaris* is an excellent model to study the straight passage of the IT from the root hair to the subepidermal cortical (for simplicity, here referred as S-E) cell layer, where cells are potentially committed to divide [4,68].

In plant cell cytokinesis initiates at the anaphase of the cell cycle and depends on the de novo formation of a disk-like endomembranous structure, known as the cell plate, constituted by an incipient plasma membrane cross-bounded by cell wall precursors. The onset of the cell plate biogenesis takes place at the center of the plane of cell division by the continuous coalescence of Golgi-derived vesicles, thus creating a disk-shaped tubulovesicular network that will grow by centrifugal expansion towards the periphery of the cell. The cytokinesis process culminates with the fusion of the cell plate membrane with the parental plasma membrane and the separation of the two daughter cells [69]. One of the proteins required for the vesicle fusion events that lead to the cell plate formation is KNOLLE, a plant cytokinesis-specific syntaxin (QaSNARE), which contains one transmembrane domain [70,71]. Transcription of the *KNOLLE* gene occurs at the G2/M transition phase of the cell cycle [72,73], and the protein is initially detected in large cytoplasmic patches in mitotic cells at anaphase. At the early telophase stage, after a vesicular fusion event, KNOLLE remains in the forming cell plate [70]. At the end of cytokinesis, KNOLLE is targeted to the vacuole for degradation [74].

To gain insights into the dynamics of the crossroads between a nascent infection thread and the first cell division event in *P. vulgaris* roots, we designed a microscopic approach that allows for the visualization of the nuclei, the cell walls, the IT progression and the cell cytokinesis status at the infection site. The latter was assessed in transgenic roots expressing the cell-plate specific marker YFP-PvKNOLLE. We have found that the epidermal infection process correlated with the reactivation of the cell cycle in S-E cells underlying the root hair that harbors an IT. As the infection progressed, the S-E cells gradually became shorter. During the formation of a microcolony in a curled root hair and the IT elongation through the body of the root hair, the nuclei in the S-E cells were mainly at the center of the cell, indicative of preparation for mitosis (G2 phase). As the IT extends towards the base of the root hair, YFP-PvKNOLLE led us to visualize a nascent cell plate in an adjacent S-E cell, indicating it was in early telophase. We also observed that the tip of the IT was at the base of the root hair at the time the underlying S-E cell presented a cell plate that apparently had concluded its expansion, suggesting a late cytokinesis stage, whereas it seemed that the IT penetrated the cell when cytokinesis was concluding.

2. Results

2.1. Epidermal Infection Progression Can Be Described in Four Stages (I-IV)

For a better appreciation of the IT progression, we used a rhizobial strain expressing the fluorescent protein DsRed [75]. To visualize the cells at the epidermal infection site, we took advantage of the cell wall autofluorescence [76,77], as illustrated in 2D projections of confocal microscopy stacks of images (Figure 1).

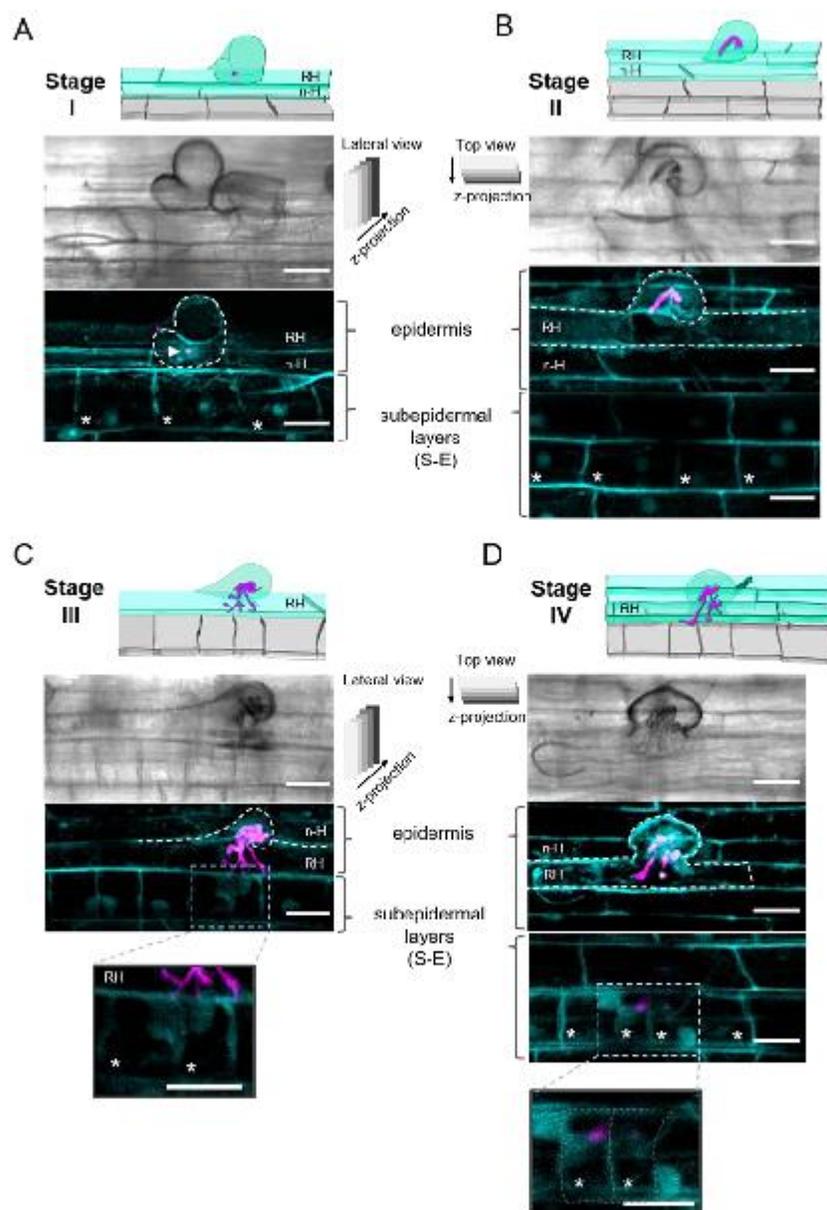


Figure 1. The four stages involved in rhizobia infection in *Phaseolus vulgaris* roots. Schematic representation and 2D projections of images from the epidermal infection sites (stages I to IV) in

P. vulgaris wild-type roots inoculated with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 and harvested at 4 days post-inoculation (dpi). Corresponding differential interference contrast (DIC) images are shown in upper panels of each set of 2D images. Images are representative of each infection thread (IT) progression stage. (A) Stage I. Formation of the microcolony in a curled root hair. The arrowhead points to the clumps of rhizobia (magenta) trapped in the fold of a curling root hair. (B) Stage II. IT that harbors rhizobia. The IT elongates in an anticlinal orientation, towards the base of the root hair. (C) Stage III. The tip of the IT reaches the base of the root hair, but it does not exit the cell. Inset: a closer view of a section in the image in C; it shows the boundary cell wall that separates the base of the root hair from the neighboring subepidermal (S-E) cells. The tips of three IT branches are next to the autofluorescent cell walls, but no rhizobium-derived fluorescent signal is observed in S-E cells, indicating that the IT has not penetrated. (D) Stage IV. A root hair harboring a branched IT is observed. Two of the IT branches have penetrated the S-E underlying cells, respectively. Inset: a closer view of a section in the image in (D); 2D projections of images were captured from (A) and (B) from a lateral view (i.e., z-stacks of a curled root hair and the S-E cells, captured from a longitudinal perspective) and (C) and (D) from a top view (i.e., z-stacks collected from the top of a curled root hair to the S-E layer), as indicated. The 2D projections of stacks from a top view are presented in two groups, corresponding to the epidermis and the subepidermal cortical layer, respectively. The contour of the cells was detected by cell wall autofluorescence (blue). *R. etli* CE3-DsRed pMP604 is in pseudo-color magenta. Dashed white lines indicate the contour of curled root hairs, and S-E cells in D. RH = root hair, n-H = non-hair epidermal cell. * Indicate the S-E cell layer underlying the root hair harboring an IT. Bars = 20 μ m.

For practicality, we divided the infection progression in four stages. Stage I corresponded to the formation of a microcolony, observed as clumps of rhizobia in the fold of a curling root hair, thus creating an infection chamber (Figure 1A). Location of the microcolony was confirmed, as illustrated in Supplementary Figure S1A. The curling zone of the root hair is laying forward on the neighboring non-hair epidermal cell, and the S-E cells are the underlying cells, as was resolved in an orthogonal 3D projection (Supplementary Figure S1B,C). Stage II involved a growing IT, which elongated in an anticlinal orientation, towards the base of the root hair, and eventually branched (Figure 1B). In Figure 1C, the IT is branched and reaches the base of the root hair, but none of the IT branches have exited the root hair, as confirmed by an analysis of orthogonal 3D projections (Supplementary Figure S2); therefore, we assigned it as an IT progression stage III. As illustrated in Figure 1D, we defined an IT at stage IV when it has penetrated an S-E cell.

2.2. Subepidermal Cells (S-E) Underneath the Infection Site Become Shorter as the Infection Thread (IT) Progresses

In a detailed analysis of representative images of the epidermal infection stages, we observed that at stages I and II, the S-E cells seemed to be shorter than those not participating in an epidermal infection. To provide insights into such observation, we performed a comparative analysis of length measurements obtained from S-E cells underlying an epidermal infection site and those of S-E cells flanking the site. As a reference, we also measured S-E cells located at the differentiation zone, susceptible to rhizobia infection, in uninoculated roots; no significant difference was found with respect to S-E cells flanking the infection site (Figure 2). In roots inoculated with rhizobia, S-E cells underneath an epidermal infection exhibited a notorious tendency to become smaller as the infection progresses from stage I to IV. In comparison to the length of S-E flanking cells, there is a reduction of approximately 42, 60, 74 and 75% in averaged cell length at stages I to IV, respectively (Figure 2).

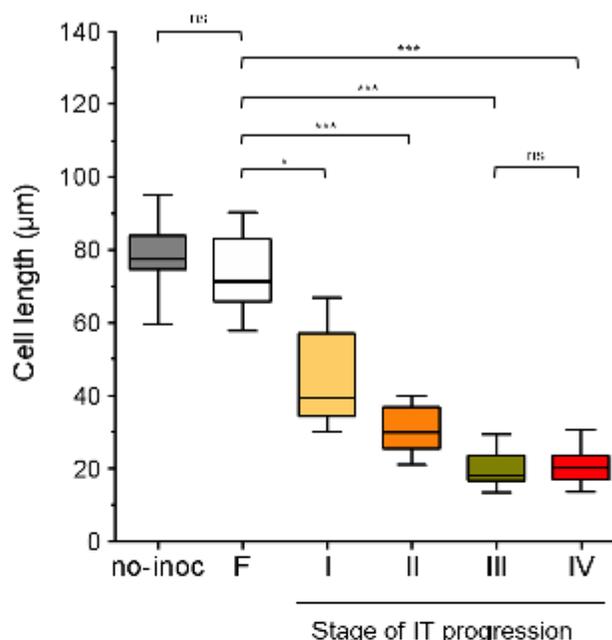


Figure 2. Length of subepidermal (S-E) cells in uninoculated and rhizobium-inoculated *P. vulgaris* roots at stages I–IV of IT progression in epidermal infection sites. Boxplot graph of cell length determined in series of independent 2D projections of S-E cells from the initial differentiation zone (susceptible for rhizobia infection) of uninoculated (no-inoc) roots or from S-E cells flanking (F) or underneath an epidermal infection at stages I–IV of the IT progression. Average (\pm standard deviation of the mean, SD) of length values: no-inoc, 78.5 ± 9.7 , $n = 14$ cells; F, 73.2 ± 9.6 , $n = 23$ cells; stage I, 46.5 ± 12.6 , $n = 23$ cells; stage II, 30.9 ± 6.5 , $n = 19$ cells; stage III, 20.2 ± 4.6 , $n = 14$ cells; 20.5 ± 4.8 , $n = 18$ cells. Data were compared using a Kruskal–Wallis test, and Dunn’s multiple comparison test was performed as a post hoc analysis considering the length of flanking (F) S-E cells as a control. The Mann–Whitney test was used for comparing data from no-inoc and F samples, or data from samples at stage III and IV, which show there is no significant difference, respectively. In graphs, * and *** indicate statistically different with $p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively; ns, no significant difference ($p > 0.05$).

The S-E cell size reduction during infection suggests that, in *P. vulgaris* nodulation, the turning on of the reactivation of cell cycle program occurs before or during the microcolony formation (stage I). The size of S-E cells at stage II may coincide with the cell conditioning for later steps of cell division, which may take place as the IT progresses to stages III and IV.

2.3. The Position of the Nucleus in the Subepidermal Cells Underlying the Epidermal Infection Site Correlates with the Infection Thread (IT) Progression

According to van Spronsen et al. [4], at initial stages of *P. vulgaris* nodulation, cortical cells that were activated for division contained swollen nuclei that were situated in the center of the cell. To explore the position of the nucleus in S-E cells at the epidermal infection site, we analyzed rhizobium-inoculated *P. vulgaris* wild-type roots stained with DAPI and transgenic roots expressing the construct *p35S::NLS-mTurquoise2*, as illustrated in Figure 3. Seeking epidermal infection events, we found root hairs with one or two rhizobia attached

to the surface of the root hair apical zone, indicative of a pre-infection stage (Figure 3A). In those cells, the nucleus was at the apical zone, close to the bacterial attachment spot (Supplementary Figure S3A), as previously described [78]. Meanwhile in root hairs at stages I (Figure 3B) and II, the nucleus was moved nearby the nascent infection site or close to the tip of the IT, respectively. At stages III (Figure 3D; Supplementary Figure S3B) and IV, it was located at the base of the root hair, similar to what happens at early stages of rhizobial infection in *M. truncatula* and *L. japonicus* [38,78,79].

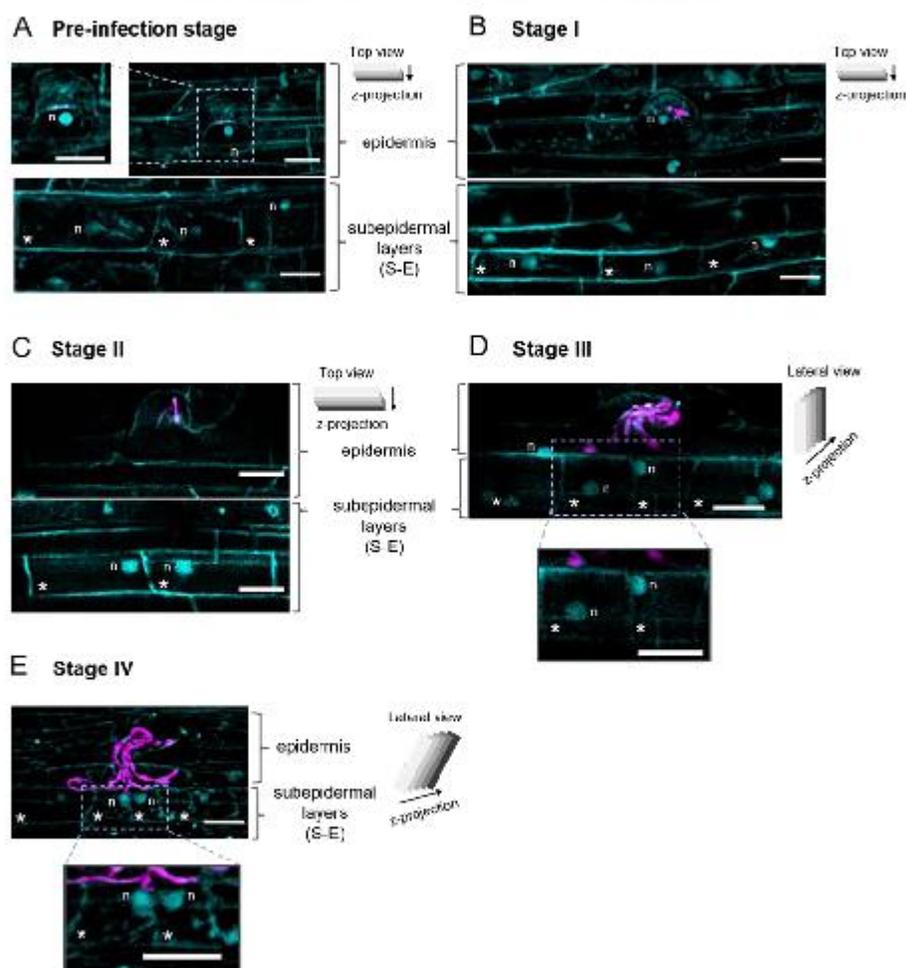


Figure 3. Visualization of the nucleus position in cells at epidermal infection site. The 2D projections of *Phaseolus vulgaris* roots expressing the nuclear marker NLS-mTurquoise2 or stained with DAPI (blue in both cases) and inoculated with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 (4 dpi). Images are representative of each infection thread (IT) progression stage. Position of the nucleus is variable but correlates with the infection progression. Root hairs at the (A) pre-infection stage, as revealed by the detection of

rhizobia (magenta) attached to the apical surface of the root hair apical zone. The nucleus was detected at the apical zone, close to the bacterial attachment spot. (B) Stage I. The nucleus moves to the nascent infection site. (D) Stage III. As the IT progresses, the nucleus relocates to the base of the root hair. In S-E cells, the nucleus is located at different positions in the cells (see Figure 4). (B) Stage I. The nuclei are predominantly located at the center of the cell. (C) Stage II. The nuclei are observed at the apical zone of the subepidermal (S-E) cells, although at this stage, they tend to be located at the center (see Figure 4). (D,E) Stages III and IV, the nuclei are distributed in different locations, with a tendency to be at the apical zone at stage IV. For a better appreciation, insets were added in panels (A,D,E), respectively. Nuclei (blue in all panels) in (A,B,E) are stained with DAPI; nuclei in (C and D) are labeled with NLS-mTurquoise2. Cell wall autofluorescence was also visualized in blue. *R. etli* CE3-DsRed pMP604 is in pseudo-color magenta. n = nucleus, RH = root hair, n-H = non-epidermal hair. * Indicates the S-E cell layer underlying the root hair harboring an IT. Additional information in panels (A–E) is as described in the legend of Figure 1. Bars = 20 μ m.

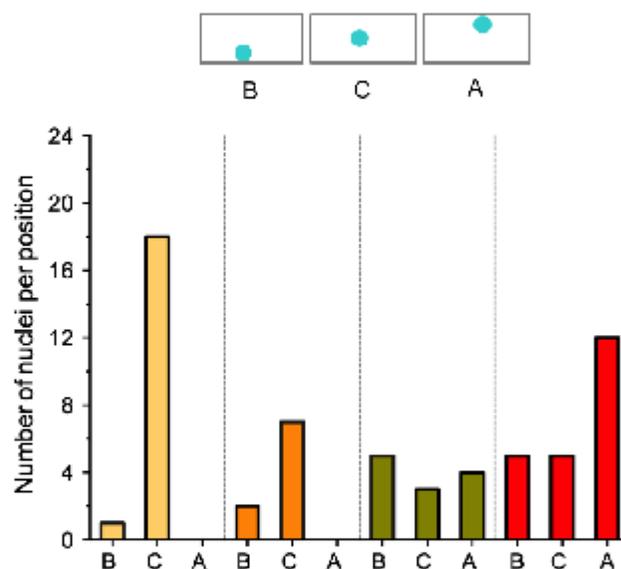


Figure 4. Distribution of the nuclei position in subepidermal (S-E) cells at stages I–IV of the IT progression. Graphic representation of the nuclei position in cells at each of the IT progression stages. Nuclei were either stained with DAPI or expressing NLS-mTurquoise2. Images were captured from 17 independent roots inoculated with *R. etli* CE3-DsRed pMP604. Number of cells (n) analyzed: stage I, n = 19; stage II, n = 9; stage III, n = 12; and stage IV, n = 22. Nuclei from each stage were classified in three groups, depending on their position in the cell: B, basal; C, central and A, apical.

In S-E cells underlying an epidermal infection, the position of the nucleus was variable, although it correlated with the infection stage (Figures 3 and 4). At stages I and II, the nuclei were mainly at the center of the cell (Figure 3B,C and Figure 4). At stages III and IV, the nuclei were observed distributed at the basal, central, and apical sides of the cells (Figure 3D,E and Figure 4), although at stage IV they were predominantly (50%) located at the apical side of the S-E cells (Figure 4). Interestingly, in those S-E cells invaded by the IT, the nucleus was frequently found nearby the penetration site, which may be related to a cell reorganization in preparation for the IT penetration.

2.4. Cell Plate-Labeling with YFP-PvKNOLLE Indicates That the Infection Thread (IT) Penetrates the Subepidermal Cell (S-E) at Late Cytokinesis

We further explored whether the IT penetration to the subepidermal layer occurs before the target cell has concluded the division process by tracing the cytokinesis marker KNOLLE. We first identified the *P. vulgaris* KNOLLE gene (Phvul.004G077900) and proceeded to analyze the promoter activity of a fragment of 1.76 kb upstream the start codon (pPvKNOLLE), which includes three Mitosis Specific Activator (MSA [80]) elements at 50 bp upstream the transcription initiation site. We confirmed that pPvKNOLLE activity was limited to the root apical meristem and events of lateral root formation, as well as in the development of nodule primordia and young nodules (Supplementary Figure S4A–E). Of particular interest for our study, pPvKNOLLE activity highlighted the dividing S-E cells underlying an epidermal infection (Supplementary Figure S4F). Hence, pPvKNOLLE confers a specific spatio-temporal activity in dividing cells. We therefore proceeded to analyze *P. vulgaris* transgenic roots bearing the construct pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE. Cytokinetic cells were easily detected in the root apical meristem (RAM) through visualizing YFP-PvKNOLLE, which pinpoints the cell plate in formation and provides information regarding the plane of cell division. As expected, abundant cells with anticlinal division were observed, but very few had periclinal orientation (Supplementary Figure S5A,B). According to their location, the latter may correspond to division of cortex initial cells (Supplementary Figure S5A). Oblique/flanking periclinal divisions [81] were rarely observed. Additional information can also be depicted from visualizing YFP-PvKNOLLE, such as the distinguishing transition and elongation zones from the RAM (Supplementary Figure S5A), measuring the distance separating the cell plates in contiguous cells (Supplementary Figure S5C) and monitoring mitotic cells from telophase until the cytokinesis is completed (Supplementary Figure S5D). Last, a comparison in the length and width of cells in the RAM versus those in the transition zone can be done (Supplementary Figure S5E). We also benefited from the restricted expression of YFP-PvKNOLLE in cytokinetic cells to track the cell plate expansion in S-E cells at the epidermal infection site.

At the microcolony-forming stage I, no YFP-PvKNOLLE signal was detected (Figure 5A), implying that neighboring S-E cells were not cytokinetic. The images presented in Figure 5B,C correspond to epidermal infections at stage II and III of the IT progression, respectively. The infected root hair at stage II of the IT progression was lying forward on the epidermis and the tip of the IT branches were close to the base of the root hair, as can be seen in Figure 5B and Figure S6A. A nascent cell plate (8 μm length) labelled with YFP-PvKNOLLE was observed in the S-E cell adjacent to a root hair that housed a branched IT (Figure 5B and Supplementary Figure S6A). According to van Oostende-Triplet et al. [82], the de novo formed disk-shaped tubulovesicular structure is typically 5.5 μm in length. It then expands rapidly, reaching 15 μm in length to further slow down until the cell plate formation is completed at late telophase. At this point, the cell plate is 20–35 μm in length. In that regard, our detection of a cell plate of 8 μm in length indicated that the S-E cell at infection stage II was cytokinetic at the early telophase. In the image illustrating an epidermal infection at stage III (Figure 5C), the tip of one of the IT branches is located close by the basal membrane of root hair, and its position leads to predict the putative penetration site (Figure 5C and Figure S6B). In the to-be invaded S-E cell, the length of the cell plate appeared to be 27 μm , suggesting a late cytokinesis status. Figure 5D illustrates a late stage IV of IT progression. Here, YFP-PvKNOLLE is labeling a post-cytokinesis cell plate structure, whose lumen seems wider (Supplementary Figure S6C) and may be in transition to become the apoplast that will separate the daughter cells. Figure 5D also shows the passage of a branch of the IT from one side of the former post-cytokinetic cell plate structure to further elongate through the contiguous daughter cell. Orthogonal 3D projections offered a better perspective of the crossing event (Supplementary Figure S6C). Last, an image of a later stage of the IT progression is presented (Figure 5E), showing how branches of an IT can penetrate several cells forming a young nodule primordium.

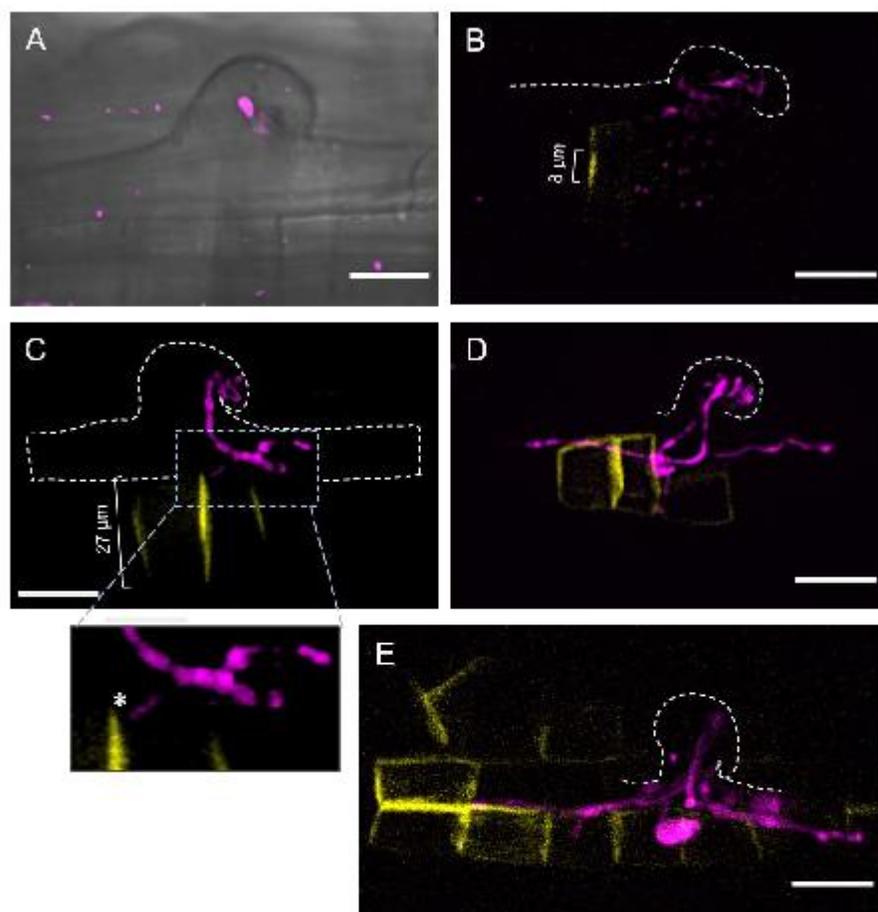


Figure 5. Visualization of the cell plate in subepidermal (S-E) cells underlying the epidermal infection at stages II and IV of the infection thread (IT) progression. The 2D projections of the epidermal infection site in *P. vulgaris* transgenic roots expressing YFP-PrKNOLLE and inoculated with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 (4 dpi). Images are representative of each IT progression stage. (A) Stage I. Fluorescence image was merged with the differential interference contrast (DIC) image to highlight the position of the microcolony in the context of the curled root hair. No YFP-PrKNOLLE signal was detected in the underlying S-E cells, indicating they are not cytokinetic. (B) Stage II. YFP-PrKNOLLE is labeling a nascent cell plate, suggesting the S-E cell is at early telophase. (C) Stage III. The cell plate is expanded to the periphery of the S-E cell underlying the infected root hair. The tip of an IT branch has reached the base of the root hair and it is close to the zone of the putative fusion of the cell plate with the parental plasma membrane, indicated with an asterisk in the inset. (D) Stage IV. The IT has exited the root hair to penetrate a post-cytokinetic underlying S-E cell, meaning the cell plate formation has concluded. (E) The IT invades several cytokinetic cells adjacent to the epidermal infection site. Length of the respective cell plate in (B,C) is indicated. *R. etli* CE3-DsRed pMP604 is in pseudo-color magenta. Dashed white lines indicate the contour of curled root hairs. Bars = 20 μ m.

Taken together, our results provide strong evidence showing that, in *P. vulgaris* nodulation, the IT does not penetrate undivided cortical cells, but rather those that have reactivated their cell cycle and are concluding cytokinesis.

3. Discussion

To gain a better understanding of the crossroads between infection and organogenesis at early stages of nodulation in *P. vulgaris* roots, we undertook a microscopy approach to document the passage of the IT from the root hair to the underlying subepidermal cortical cell layer (S-E), where the first CCD occurs. This biological circumstance is unique. In the nodulation models *L. japonicus* and *M. truncatula*, those events are separated by two to five cortical layers, respectively [3,4].

Regarding the IT progression, even though it is difficult to visualize it through a coarse root hair, as in *P. vulgaris*, we found the process is quite similar to the IT development in *L. japonicus* and *M. truncatula* [6,83]. Autofluorescence around the microcolony (Figures 1A and 6) allowed us to predict an infection chamber. According to Fournier et al. [32], the infection chamber provides the environment for the initial proliferation and conditioning of rhizobia for their entry to the root hair and favors the cell wall remodeling and plasma membrane invagination that give rise to the initial IT structure [32]. In *M. truncatula*, it takes approximately 15 to 18 h to initiate an IT from a curled root hair [32]. Whilst the microcolony is forming, the nucleus moves towards the tip of the root hair, to subsequently move through the body of the root hair, presumably guiding the IT towards the base of the cell (Figures 3 and 6) [78,79,84].

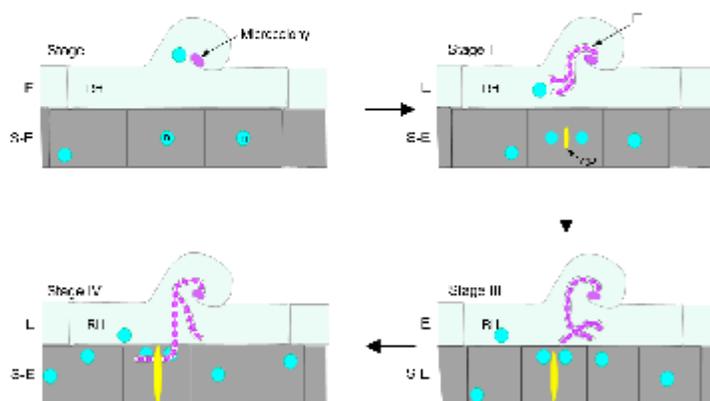


Figure 6. Schematic representation of the dynamics between the infection thread (IT) progression and the reactivation of the cell cycle. Infection thread (IT) progression was divided in stages I–IV, in which cells become successively shorter. Stage I: Rhizobia (magenta) is forming a microcolony, and the cell nucleus (circles in blue) is mainly at the center of the cell. No cell plate (CP, in yellow) is distinguished. Stage II: IT is formed and branched. A nascent CP is observed when the IT tip is close in the body of the RH. Stage III: the tip of the IT reaches the base of the RH and the CP use to be at the end of expansion process, suggesting a late cytokinesis in expansion. Stage IV: the IT has penetrated an adjacent subepidermal (S-E) cell and may cross the CP that is fully expanded, indicative of a post-cytokinetic status. E, epidermis.

As the IT progresses, the cortical cells adjacent to the infection site must be committed and be prepared for the IT invasion [10,85]. The fate of the IT exiting the root hair in *P. vulgaris* is to penetrate a S-E dividing cell, whereas in *M. truncatula*, *M. sativa*, *L. japonicus* and other nodulation models, the IT faces S-E cells that have reactivated their cell cycle but do not enter mitosis [63]. This reactivation is indicated by the induced formation of

a cytoplasmic bridge in the outermost cortical layers opposite to an epidermal infection site [4,85,86]. In highly vacuolated cells, such as root cortical cells and tobacco BY-2 cells, the cytoplasmic bridges or phragmosome are related to the cell division [87]. In this type of cell at the G1 phase, the vacuolar system is fragmented. At the G2 phase, the nucleus is displaced to the central region of the cell and a sheet of cytoplasm and arrays of microtubules are radiating from the nucleus to the cell periphery. Afterwards, a transvacuolar cytoplasmic disc gradually accumulates across the central region of the cell, forming a cytoplasmic bridge, where later the phragmoplast will form [87–89]. In the nodulation of *Medicago*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum* and *L. japonicus*, the cytoplasmic bridge, also designated as pre-infection thread, provides the path to cross the root cortex until reaching the forming nodule primordium [4,85,86]. Moreover, it has been postulated that formation of the pre-infection thread is involved in the weakening and deformation of the cell wall at the site where the IT will gain access to the neighboring cell [86]. No pre-infection threads have been observed in *P. vulgaris* roots, by means of histological examination [4]. Though it would be interesting to further address that issue by studying the vacuolar and microtubule dynamics in S-E cells upon inoculation with rhizobia, which is a matter of future research. However, we gained some insights into that direction by analyzing the cell length and nucleus distribution in *P. vulgaris* S-E cells underlying an epidermal infection. At stage I of infection, when a microcolony was observed in a curled root hair, these S-E cells were shorter than flanking cortical cells, and their nuclei were mostly at the center of the cell (Figures 2, 4 and 6). These parameters suggest the cell cycle was reactivated in those cells and potentially progressed to the G2 phase [90], though the appropriate analysis needs to be performed to better estimate the cell cycle reactivation dynamics and duration. It is noteworthy to mention that similar criteria were applied to distinguish dividing from undividing cells in *M. truncatula* roots overexpressing *ena440*, where an extensive inner cortical cell division was observed in the absence of rhizobia [76]. Moreover, the description of cortical cell division deficiency and the rhizobium-independent CCD phenotypes of a series of mutants in gene-silencing experiments often refers to the detection of a row of cortical cells shorter than in the control roots [19,60,67,91]. The same experimental strategy was used to demonstrate the mitogenic activity of purified Nod factors and the effect of plant hormones on CCD in nodulation [92–94]. In that regard, it would be interesting to have an estimation on the delay between the cell cycle reactivation and the conclusion of cytokinesis in those cortical cells participating in the nodulation process. Even though it certainly will be a difficult task in roots as thick as those in *P. vulgaris*, such an analysis would set the experimental conditions to address the molecular and cellular mechanisms underlying the cell cycle reactivation. As a reference, the duration of S/G2 and M phases within the root apical meristem and the transition zone in *Arabidopsis* roots was approximately 5 h, where mitosis had an estimated duration of 20–25 min [95].

Our conclusions on the cell cycle activation of S-E cells were further supported by the analysis of the epidermal infection in transgenic roots expressing the cytokinesis marker YFP-*PvKNOLLE*, in which formation and expansion of the cell plate was easily traced. We found that, as the IT progressed towards the base of the root hair (stage II), a cell plate became visible in the underlying S-E cell (Figures 5 and 6). In tobacco BY2 cells, a nascent cell plate was detected at early telophase, as a disk-shaped structure of approximately 5 μm in length [82]. Detection of a YFP-*PvKNOLLE*-labelled structure with a similar size in S-E cells underlying an epidermal infection stage II led us to conclude that those cells were at telophase.

Visualization of the IT passage from the base of the root hair to the neighboring S-E cell was the main focus of our work. With that aim, we documented the cell plate expansion during late telophase and cytokinesis, finding a correlation between the position of the IT tip at the base of the root hair (IT progression stage III) at the time the underlying S-E cell presented a cell plate that apparently had concluded its expansion, suggesting a late cytokinesis (Figure 5C, Figure 6 and Figure S6B). At a later stage of the IT progression (stage IV, as illustrated in Figure 5D and Figure S6C), the IT had already penetrated the

underlying S-E cell, when the cell was at a post-cytokinetic status. The IT was further expanded to the next S-E cells (Figure 5D,E and Figure 6).

In summary, we presented a punctual description of the crossroad between the IT pre- and post-penetration of the neighbor cell and the cytokinesis progression in the targeting cell (Figure 6). Our findings provide strong evidence supporting the notion of a coordination between the IT exit from the root hair and the progression of cell cycle in the neighboring cell that will give access to the IT. We also demonstrated that, in *P. vulgaris* roots, the IT is capable of penetrating a cytokinetic cell. In that regard, it is reasonable to postulate that the signaling induced at early stages of *P. vulgaris* nodulation leads to a direct molecular instruction not only intended to reactivate the cell cycle in S-E cells, but to proceed to cell division, a challenging question that may be worth exploring in future studies.

4. Materials and Methods

4.1. Plants and Bacteria Growth Conditions

Phaseolus vulgaris cv. Negro Jamapa (common bean) seeds were obtained from local farmers in Morelos, Mexico. Seeds were surface sterilized with 70% alcohol (1 min) and 20% commercial chlorine (5 min). Subsequently, seeds were germinated at 28 °C for 48 h in the dark, as previously described [75]. Two days post-germination (dpg) seedlings or composite plants were transferred to pots containing vermiculite and inoculated with *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604 [75], diluted in 10 mM MgSO₄ to an OD_{600nm} of 0.05. Plants were grown under controlled environment conditions (28 °C, 16 h/8 h photoperiod), were watered with nitrogen-free Fåhræus medium [96] and harvested at the indicated time points. Composite plants with transgenic roots were generated using the *Agrobacterium rhizogenes* K599-dependent transformation protocol, as previously described [25]. *A. rhizogenes* and *R. etli* strains were grown at 30 °C for 48 h in LB or PY media, respectively.

4.2. Plasmid Constructions

The sequence of *P. vulgaris* KNOLLE gene was identified in the Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/> (accessed on 30 June 2018), accession number Phvul.004G077900). For the analysis of *PvKNOLLE* promoter (*pPvKNOLLE*) activity, the sequence of a 1.76 kb fragment upstream from the start codon was amplified by PCR from genomic DNA using gene-specific primers. The PCR product was then cloned by recombination (Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix, Invitrogen, Waltham, MA, USA) into the plant vector pBGWFS7 to generate the *pPvKNOLLE::GFP-GUS* transcriptional fusion. To construct the expression cassette *pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*, the *PvKNOLLE* coding sequence (953 bp) was amplified in a RT-PCR reaction using total RNA from *P. vulgaris* root apex and the primers *PvKNOLLE-ATG* and *PvKNOLLE-stop*. The PCR product was then recombined into the plant vector pEarleyGate 104 to create the cassette *p35S::YFP-PvKNOLLE*. The last step consisted in the substitution of *p35S* sequence with the *pPvKNOLLE* fragment using *EcoRI* and *NcoI* and ligation strategy, leading to plasmid, pEarleyGate104_ *pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*. To generate the expression cassette *p35S::NLS-mTurquoise2*, a chimeric cDNA coding for NLS-mTurquoise2 (751pb) was PCR amplified using the primer NLS-Turquoise UP, which comprises 24 nucleotides coding for the NLS sequence in frame with 18 nucleotides of the 5' end of the mTurquoise2 coding sequence, and the primer Turquoise LW. Plasmid pmTurquoise2-ER was used as template. NLS-mTurquoise2 cDNA was subcloned by recombination into the vector pK2GW7 to generate the transcriptional fusion *p35S::NLS-mTurquoise2 (pK2GW7-NLS-mTurquoise2)*. All cloning steps were performed in *E. coli* DH5 α , confirmed by sequencing and electroporated into *A. rhizogenes* K599. The primer information is listed in Supplementary Table S1.

4.3. Fixation and DAPI Staining Conditions

P. vulgaris wild-type roots were harvested at 4 days post-inoculation (dpi) with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 and were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) in 80 mM PIPES pH7 solution. Then, samples were rinsed three times for 5 min in 80 mM PIPES pH 7.0 [77]. Nuclei in fixed roots were stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) at 1 µg/mL in 0.1% (v/v) Triton X-100 for 30 min in the dark at room temperature and washed three times with water.

4.4. Confocal Imaging

P. vulgaris wild-type and composite plants were harvested and placed in a modified polystyrene square Petri dish, in which part of the bottom was manually replaced by a glass cover slip (48 × 65 mm). The roots were whole mounted on the coverslip containing 1 ml of Fåhræus medium, covered with a sweet cellophane sheet and observed in an inverted confocal laser scanning microscope FV1000 (with a 40×/NA 0.75 dry objective). DAPI, mTurquoise2 and autofluorescence of cell wall components were excited with 405 nm and detected at 430–470 nm. YFP and DsRed were visualized with 488 nm and 543 nm excitation, respectively, with fluorescence emission at 505–525 nm and 560–660 nm, respectively. Z-stacks were collected using a resolution of 800 × 800 pixels and were taken at a step size of 0.8–1.0 µm. YFP-KNOLLE images were captured using a 3I Marianas Confocal Spinning Disk Microscope coupled to a Zeiss Observer Z.1 Inverted type (water ×40 objective 0.75 N.A., ZEISS, Jena, Germany).

4.5. Image Processing and 3D Visualization

The 2D analysis of z-stack confocal images was carried out with ImageJ/Fiji software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The z-stacks were analyzed using the maximum intensity projection to generate 2D images.

Deconvolution was applied to each stack of images for each channel. The deconvolution was performed using the “Iterative Deconvolve 3D” plugin in ImageJ and “Diffraction PSF 3D” for the creation of theoretical PSF, with 4–10 maximum iterations. To generate the 3D reconstructions, the two-channel z-stack (DAPI or NLS-mTurquoise2 + DsRed; YFP-PvKNOLLE + DsRed channels) was merged and converted to RGB format, using the menu command Image>Type>RGB color. Three-dimensional reconstructions were created using Vaa3D[®] software (3D Visualization-Assisted Analysis) [97].

4.6. Statistical Analysis

To validate the quantitative analysis and confirm the reproducibility of the results, statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism version 6 and considering a series of biological replicates, as indicated. The difference between values from incubation times in time-course experiments were evaluated using Kruskal–Wallis test, Mann–Whitney test, Dunn’s multiple comparison test or Student’s *t*-test, as indicated. *p* values are indicated in the figure legends.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23095267/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.S.-L. and A.G.-d.; Methodology, E.M.-M., R.D.-D. and E.A.-G.; Software, E.M.-M. and R.D.-D.; Formal Analysis, E.M.-M. and R.D.-D., A.G.-d. and R.S.-L.; Writing—Original Draft Preparation, E.M.-M. and R.S.-L. Writing—Review and Editing, A.G.-d. and R.S.-L.; Visualization, A.G.-d. and R.S.-L. Supervision, A.G.-d. and R.S.-L.; Project Administration, R.S.-L.; Funding Acquisition, R.S.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM (PAPIIT/UNAM IN206118 and IN204721 to R.S.L.) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) with PhD fellowships to E.M.-M. (595064) and R.D.-D. (288601).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Elizabeth Monroy-Morales is a doctoral student from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and this paper constitutes a partial fulfillment of her doctoral formation. We thank J. Arturo Pimentel Cabrera (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, UNAM) for technical assistance in confocal microscopy, as well as Eugenio López Bustos, Jorge Arturo Yañez Ponce de León and Rubén Paul Gaytán Colín (Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBT-UNAM). We also thank Shirley E. Ainsworth for library services (Unidad de Biblioteca, IBT-UNAM), and M.T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, Ing. Roberto P. Rodríguez Bahena, M.E.M. David Santiago Castañeda Carreón, L.I. Jesús Omar Arriaga Pérez and M.C. Arturo Ocádiz Ramírez for computer services (Unidad de Cómputo, IBT-UNAM). mYurquoise2 plasmid was kindly provided by Takuya Nishigaki Shimizu (IBT-UNAM). We thank Alexandre Tromas for plasmid containing NLS3XmVenus (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM). We also thank Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT-UNAM) for his technical advice in image processing. The participation of Jonathan Cuellar Vega (bachelor student) at the initial stage of this project is also gratefully acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Patriarca, E.J.; Tatè, R.; Ferraioli, S.; Iaccarino, M. Organogenesis of Legume Root Nodules. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *234*, 201–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Guinel, F.C. Getting around the legume nodule: II. Molecular biology of its peripheral zone and approaches to study its vasculature. *Botany* **2009**, *87*, 1139–1166. [[CrossRef](#)]
3. Xiao, Y.T.; Schilderink, S.; Moling, S.; Deinum, E.E.; Kondorosi, E.; Franssen, H.; Kulikova, O.; Niebel, A.; Bisseling, Y. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **2014**, *141*, 3517–3528. [[CrossRef](#)]
4. Van Spronsen, P.C.; Grönlund, M.; Bras, C.P.; Spaink, H.P.; Kijne, J.W. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 839–847. [[CrossRef](#)]
5. Ferguson, B.J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, M.G.; Lin, Y.H.; Reid, D.E.; Gresshoff, P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant. Biol.* **2010**, *52*, 61–76. [[CrossRef](#)]
6. Oldroyd, G.E.D.; Downie, J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 519–546. [[CrossRef](#)]
7. Madsen, L.H.; Tirichine, L.; Jurkiewicz, A.; Sullivan, J.T.; Heckmann, A.B.; Bek, A.S.; Ronson, C.W.; James, E.K.; Stougaard, J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 1–12. [[CrossRef](#)]
8. Lebedeva, M.; Azarakhsh, M.; Sadikova, D.; Lutova, L. At the root of nodule organogenesis: Conserved regulatory pathways recruited by rhizobia. *Plants* **2021**, *10*, 2654. [[CrossRef](#)]
9. Murray, J.D. Invasion by invitation: Rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 631–639. [[CrossRef](#)]
10. Tsyganova, A.V.; Brewin, N.J.; Tsyganov, V.E. Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads. *Cells* **2021**, *10*, 1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. White, J.; Prell, J.; James, E.K.; Poole, P. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 604–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Suzaki, Y.; Ito, M.; Kawaguchi, M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Franssen, H.J.; Xiao, Y.T.; Kulikova, O.; Wan, X.; Bisseling, Y.; Scheres, B.; Heidstra, R. Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. *Development* **2015**, *142*, 2941–2950. [[CrossRef](#)]
14. Guinel, F.C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ng, J.L.P.; Hassan, S.; Yuong, Y.T.; Hocart, C.H.; Laffont, C.; Frugier, F.; Mathesius, U. Flavonoids and auxin transport inhibitors rescue symbiotic nodulation in the *Medicago truncatula* cytokinin perception mutant *cae1*. *Plant Cell.* **2015**, *27*, 2210–2226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gamas, P.; Brault, M.; Jardinaud, M.F.; Frugier, F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 792–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kohlen, W.; Ng, J.L.P.; Deinum, E.E.; Mathesius, U. Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: Indeterminate and determinate nodules. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 229–244. [[CrossRef](#)]

18. Mergaert, P.; Kereszt, A.; Kondorosi, E. Gene Expression in Nitrogen-Fixing Symbiotic Nodule Cells in *Medicago truncatula* and Other Nodulating Plants. *Plant Cell*. 2020, 32, 42–68. [\[CrossRef\]](#)
19. Suzuki, Y.; Yano, K.; Ito, M.; Umehara, Y.; Suganuma, N.; Kawaguchi, M. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development* 2012, 139, 3997–4006. [\[CrossRef\]](#)
20. Yan, S.; Sanchez, M.; Laffont, C.; Boivin, S.; Signor, C.L.; Thompson, R.; Frugier, F.; Brault, M. A cytokinin signaling type-b response regulator transcription factor acting in early nodulation1. *Plant Physiol.* 2020, 183, 1319–1330. [\[CrossRef\]](#)
21. Catoira, R.; Galera, C.; de Billy, E.; Penmetsa, R.V.; Journet, E.P.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Dénarié, J. Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell*. 2000, 12, 1647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Endre, G.; Kereszt, A.; Kevei, Z.; Mihacea, S.; Kaló, P.; Kiss, G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002, 417, 962–966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Stracke, S.; Kistner, C.; Yoshida, S.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Szczygłowski, K.; et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 2002, 417, 959–962. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Madsen, E.B.; Felle, H.H.; Umehara, Y.; Grönlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Niels Sandal, N.; et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two *LysM* receptor-like kinases. *Nature* 2003, 425, 585–592. [\[CrossRef\]](#)
25. Sánchez-López, R.; Jauregui, D.; Nava, N.; Alvarado-Affantranger, X.; Montiel, J.; Santana, O.; Sanchez, F.; Quinto, C. Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ.* 2011, 34, 2109–2121. [\[CrossRef\]](#)
26. Ke, D.; Fang, Q.; Chen, C.; Zhu, H.; Chen, Y.; Chang, X.; Yuan, S.; Kang, H.; Ma, L.; Hong, Z.; et al. The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2012, 159, 131–143. [\[CrossRef\]](#)
27. Wang, C.; Zhu, M.; Duan, L.; Alvarado-Affantranger, X.; Montiel, J.; Santana, O.; Sanchez, F.; Quinto, C. *Lotus japonicus* clathrin heavy chain1 is associated with rho-like GTPase ROP6 and involved in nodule formation. *Plant Physiol.* 2015, 167, 1497–1510. [\[CrossRef\]](#)
28. Lei, M.J.; Wang, Q.; Li, X.; Chen, A.; Luo, L.; Xie, Y.; Li, G.; Luo, D.; Mysore, K.S.; Wen, J.; et al. The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation. *Plant Cell*. 2015, 27, 806–822. [\[CrossRef\]](#)
29. Blanco, F.A.; Meschini, E.P.; Zanetti, M.E.; Aguilar, O.M. A small GTPase of the rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-rhizobium symbiotic association. *Plant Cell*. 2009, 21, 2797–2810. [\[CrossRef\]](#)
30. Via, D.V.; Traubenik, S.; Rivero, C.; Aguilar, O.M.; Zanetti, M.E.; Blanco, F.A. The monomeric GTPase RabA2 is required for progression and maintenance of membrane integrity of infection threads during root nodule symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 2017, 93, 549–562. [\[CrossRef\]](#)
31. García-Soto, I.; Boussageon, R.; Cruz-Farfán, Y.M.; Castro-Chilpa, J.D.; Hernández-Cerezo, L.X.; Bustos-Zagal, V.; Leija-Salas, A.; Hernández, G.; Torres, M.; Formey, D.; et al. The *Lotus japonicus* ROP3 Is Involved in the Establishment of the Nitrogen-Fixing Symbiosis but Not of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Front. Plant Sci.* 2021, 12, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Fournier, J.; Teillet, A.; Chabaud, M.; Ivanov, S.; Genre, A.; Limpens, E.; Carvalho-Niebel, F.; Barker, D.G. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* 2015, 167, 1233–1242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Xie, F.; Murray, J.D.; Kim, J.; Jurkiewicz, A.; Rueda, P.; Radutoiu, S.; Held, M.; Hossain, M.S.; Szczygłowski, K.; Morieri, G.; et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 633–638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Yokota, K.; Fukai, E.; Madsen, L.H.; Jurkiewicz, A.; Rueda, P.; Radutoiu, S.; Held, M.; Hossain, M.S.; Szczygłowski, K.; Morieri, G.; et al. Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell*. 2009, 21, 267–284. [\[CrossRef\]](#)
35. Haney, C.H.; Long, S.R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 478–483. [\[CrossRef\]](#)
36. Miyahara, A.; Richens, J.; Starker, C.; Morieri, G.; Smith, L.; Long, S.; Downie, J.A.; Oldroyd, G.E.D. Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component during Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2010, 23, 1553–1562. [\[CrossRef\]](#)
37. Hossain, M.S.; Liao, J.; James, E.K.; Sato, S.; Tabata, S.; Jurkiewicz, A.; Madsen, L.H.; Stougaard, S.; Ross, L.; Szczygłowski, K. *Lotus japonicus* ARPCI is required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* 2012, 160, 917–928. [\[CrossRef\]](#)
38. Perrine-Walker, E.M.; Lartaud, M.; Kouchi, H.; Ridge, R.W. Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Protoplasma* 2014, 251, 1099–1111. [\[CrossRef\]](#)
39. Qiu, L.; Lin, J.S.; Xu, J.; Sato, S.; Parniske, M.; Wang, T.L.; Downie, J.A.; Xie, F. SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genet.* 2015, 11, 1–27. [\[CrossRef\]](#)
40. Liang, P.; Schmitz, C.; Lacey, B.; Ditengou, F.A.; Su, C.; Schulze, E.; Knerr, J.; Grosse, R.; Keller, J.; Libourel, C.; et al. Formin-mediated bridging of cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*. *Curr. Biol.* 2021, 31, 2712–2719.e5. [\[CrossRef\]](#)

41. Den Herder, G.; De Keyser, A.; De Rycke, R.; Rombauts, S.; Van de Velde, W.; Clemente, M.R.; Verplancke, C.; Mergaert, P.; Kondorosi, E.; Holsters, M.; et al. Seven in absentia proteins affect plant growth and nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 369–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Yano, K.; Shibata, S.; Chen, W.L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Jurkiewicz, A.; Sandal, N.; Banba, M.; Imaizumi-Anraku, H.; Kojima, Y.; et al. CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J.* **2009**, *60*, 168–180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Mbengue, M.; Camut, S.; de Carvalho-Niebel, F.; Deslandes, L.; Froidure, S.; Klaus-Heisen, D.; Moreau, S.; Rivas, S.; Timmers, T.; Hervé, C.; et al. The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. *Plant Cell* **2010**, *22*, 3474–3488. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Marsh, J.F.; Rakocevic, A.; Mitra, R.M.; Brocard, L.; Sun, J.; Eschstruth, A.; Long, S.R.; Schultze, M.; Ratet, P.; Oldroyd, G.E.D. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 324–335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Yano, K.; Yoshida, S.; Müller, J.; Singh, S.; Banba, M.; Vickers, K.; Markmann, K.; White, C.; Schuller, B.; Sato, S.; et al. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20540–20545. [\[CrossRef\]](#)
46. Zanetti, M.E.; Blanco, F.A.; Becker, M.P.; Battaglia, M.; Aguilar, O.M. A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-Rhizobium *etli* Symbiosis. *Plant Cell* **2010**, *22*, 4142–4157. [\[CrossRef\]](#)
47. Laporte, P.; Lepage, A.; Fournier, J.; Catrice, O.; Moreau, S.; Jardinaud, M.F.; Mun, J.H.; Larrainzar, E.; Cook, D.R.; Gamas, P.; et al. The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 481–494. [\[CrossRef\]](#)
48. Singh, S.; Katzer, K.; Lambert, J.; Cerri, M.; Parniske, M. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 139–152. [\[CrossRef\]](#)
49. Vernié, T.; Kim, J.; Frances, L.; Ding, Y.; Sun, J.; Guan, D.; Niebel, A.; Gifford, M.L.; Carvalho-Niebel, F.; Oldroyd, G.E.D. The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root. *Plant Cell* **2015**, *27*, 3410–3424. [\[CrossRef\]](#)
50. Cerri, M.R.; Frances, L.; Kelner, A.; Fournier, J.; Middleton, P.H.; Auriac, M.H.; Mysore, K.S.; Wen, J.; Erard, M.; Barker, D.G.; et al. The symbiosis-related ERN transcription factors act in concert to coordinate rhizobial host root infection. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, 1037–1054. [\[CrossRef\]](#)
51. Kawaharada, Y.; James, E.K.; Kelly, S.; Sandal, N.; Stougaard, J. The ethylene responsive factor required for nodulation 1 (ERN1) transcription factor is required for infection-thread formation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2017**, *30*, 194–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Soyano, T.; Kouchi, H.; Hirota, A.; Hayashi, M. NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Breakspear, A.; Liu, C.; Roy, S.; Stacey, N.; Rogers, C.; Trick, M.; Morieri, G.; Mysore, K.S.; Wen, J.; Oldroyd, G.E.D.; et al. The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell* **2014**, *26*, 4680–4701. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Maekawa, T.; Maekawa-Yoshikawa, M.; Takeeda, N.; Imaizumi-Anraku, H.; Murooka, Y.; Hayashi, M. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J.* **2009**, *58*, 183–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Jin, Y.; Liu, H.; Luo, D.; Yu, N.; Dong, W.; Wang, C.; Zhang, X.; Dai, H.; Yang, J.; Wang, E. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
56. Dong, W.; Zhu, Y.; Chang, H.; Wang, C.; Yang, J.; Shi, J.; Gao, J.; Yang, W.; Lan, L.; Wang, Y.; et al. An SHR-SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation. *Nature* **2021**, *589*, 586–590. [\[CrossRef\]](#)
57. Heidstra, R.; Yang, W.C.; Yalcin, Y.; Peck, S.; Emons, A.; Kammen, A.; Bisseling, T. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in Rhizobium-legume interaction. *Development* **1997**, *124*, 1781–1787. [\[CrossRef\]](#)
58. Pacios-Bras, C.; Schlaman, H.R.M.; Boot, K.; Admiraal, P.; Langerak, J.L.; Stougaard, J.; Spaink, H.P. Auxin distribution in *Lotus japonicus* during root nodule development. *Plant Mol. Biol.* **2003**, *52*, 1169–1180. [\[CrossRef\]](#)
59. Roudier, F.; Fedorova, E.; Lebris, M.; Lecomte, P.; Gyöngyey, J.; Vaubert, D.; Horvath, G.; Abad, P.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E. The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol.* **2003**, *131*, 1091–1103. [\[CrossRef\]](#)
60. Gonzalez-Rizzo, S.; Crespi, M.; Frugier, F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **2006**, *18*, 2680–2693. [\[CrossRef\]](#)
61. Prayitno, J.; Rolfe, B.G.; Mathesius, U. The ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 168–180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Murray, J.D.; Karas, B.J.; Sato, S.; Tabata, S.; Amyot, L.; Szczygłowski, K. A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science* **2007**, *315*, 101–104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Yang, W.C.; De Blank, C.; Meskiene, I.; Hirt, H.; Bakker, J.; van Kammen, A.; Franssen, H.; Bisseling, T. Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **1994**, *6*, 1415–1426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

64. Libbenga, K.R.; van Iren, F.; Bogers, R.J.; Schraag-Lamers, M.F. The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in *Pisum sativum* L. *Planta* **1973**, *114*, 29–39. [\[CrossRef\]](#)
65. Mathesius, U.; Schlaman, H.R.M.; Spaink, H.P.; Sautter, C.; Rolfe, B.G.; Djordjevic, M.A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* **1998**, *14*, 23–34. [\[CrossRef\]](#)
66. Nizampatnam, N.R.; Schreier, S.J.; Damodaran, S.; Adhikari, S.; Subramanian, S. MicroRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *Plant J.* **2015**, *84*, 140–153. [\[CrossRef\]](#)
67. Trichine, L.; Sandal, N.; Madsen, L.H.; Radutoiu, S.; Albrektson, A.S.; Sato, S.; Asamizu, E.; Tabata, S.; Stougaard, J. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **2007**, *315*, 104–107. [\[CrossRef\]](#)
68. Tate, R.; Patriarca, E.J.; Riccio, A.; Defez, R.; Iaccarino, M. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1994**, *7*, 582–589. [\[CrossRef\]](#)
69. Jürgens, G. Cytokinesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 281–299. [\[CrossRef\]](#)
70. Lauber, M.H.; Waizenegger, I.; Steinmann, T.; Schwarz, H.; Mayer, U.; Hwang, I.; Lukowitz, W.; Jürgens, G. The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 1485–1493. [\[CrossRef\]](#)
71. Youihri, S.; Knöll, C.; Stierhof, Y.D.; Müller, I.; Mayer, U.; Jürgens, G. Functional anatomy of the Arabidopsis cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE. *Plant J.* **2011**, *68*, 755–764. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Lukowitz, W.; Mayer, U.; Jürgens, G. Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* **1996**, *84*, 61–71. [\[CrossRef\]](#)
73. Menges, M.; De Jager, S.M.; Gruijssem, W.; Murray, J.A.H. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **2005**, *41*, 546–566. [\[CrossRef\]](#)
74. Reichardt, I.; Stierhof, Y.D.; Mayer, U.; Richter, S.; Schwarz, H.; Schumacher, K.; Jürgens, G. Plant Cytokinesis Requires De Novo Secretory Trafficking but Not Endocytosis. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 2047–2053. [\[CrossRef\]](#)
75. Dávila-Delgado, R.; Bafielos-Vazquez, L.A.; Monroy-Morales, E.; Sánchez-López, R. *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604: A useful biological tool to study initial infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation. *Planta* **2020**, *252*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
76. Charon, C.; Johansson, C.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A.; Crespi, M. Enod40 Induces Dedifferentiation and Division of Root Cortical Cells in Legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8901–8906. [\[CrossRef\]](#)
77. Nadzieja, M.; Stougaard, J.; Reid, D. A Toolkit for High Resolution Imaging of Cell Division and Phytohormone Signaling in Legume Roots and Root Nodules. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
78. Liu, C.W.; Breakspear, A.; Stacey, N.; Findlay, K.; Nakashima, J.; Ramakrishnan, K.; Liu, M.; Xie, F.; Endre, G.; de Carvalho-Niebel, F.; et al. A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
79. Fournier, J.; Timmers, A.C.J.; Sieberer, B.J.; Jauneau, A.; Chabaud, M.; Barker, D.G. Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 1985–1995. [\[CrossRef\]](#)
80. Ito, M.; Araki, S.; Matsunaga, S.; Itoh, Y.; Nishihama, R.; Machida, Y.; Doonan, J.H.; Watanabe, A. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell.* **2001**, *13*, 1891–1905. [\[CrossRef\]](#)
81. Schütz, L.M.; Louveaux, M.; Vilches Barro, A.; Bouziri, S.; Cerrone, L.; Wolny, A.; Kreshuk, A.; Hamprecht, F.A.; Maize, A. Integration of Cell Growth and Asymmetric Division during Lateral Root Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **2021**, *62*, 1269–1279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. van Oostende-Triplet, C.; Guillet, D.; Triplet, Y.; Pandzic, E.; Wiseman, P.W.; Geitmann, A. Vesicle dynamics during plant cell cytokinesis reveals distinct developmental phases. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 1544–1558. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Gage, D.J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 280–300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Perrine-Walker, E.M.; Kouchi, H.; Ridge, R.W. Endoplasmic reticulum-targeted GFP reveals ER remodeling in Mesorhizobium-treated *Lotus japonicus* root hairs during root hair curling and infection thread formation. *Protoplasma* **2014**, *251*, 817–826. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Timmers, A.C.J.; Auriac, M.C.; Truchet, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **1999**, *126*, 3617–3628. [\[CrossRef\]](#)
86. Van Brussel, A.A.N.; Bakhuizen, R.; Van Spronsen, P.C.; Spaink, H.P.; Tak, Y.; Lugtenberg, B.J.J.; Kijne, J.W. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of rhizobium. *Science* **1992**, *257*, 70–72. [\[CrossRef\]](#)
87. Esau, K.; Gill, R.H. Distribution of Vacuoles and Some Other Organelles in Dividing Cells. *Bot. Gaz.* **1991**, *152*, 397–407. [\[CrossRef\]](#)
88. Bakhuizen, R.; van Spronsen, P.C.; Sluiman-den Hertog, F.A.J.; Venverloo, C.J.; Goosen-de Roo, L. Nuclear envelope radiating microtubules in plant cells during interphase mitosis transition. *Protoplasma* **1985**, *128*, 43–51. [\[CrossRef\]](#)
89. Kutsuna, N.; Hasezawa, S. Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 965–973. [\[CrossRef\]](#)
90. Wright, A.J.; Smith, L.G. Division plane orientation in plant cells. *Plant Cell Monogr.* **2007**, *9*, 33–57. [\[CrossRef\]](#)

91. Tsyganov, V.E.; Voroshilova, V.A.; Priefer, U.B.; Borisov, A.Y.; Tikhonovich, I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the Rhizobium-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis. *Ann. Bot.* **2002**, *89*, 357–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bauer, P.; Ratet, P.; Crespi, M.D.; Schultze, M.; Kondorosi, A. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEinoD12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* **1996**, *10*, 91–105. [[CrossRef](#)]
93. Reid, D.; Nadzieja, M.; Novák, O.; Heckmann, A.B.; Sandal, N.; Stougaard, J. Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiol.* **2017**, *175*, 361–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Heckmann, A.B.; Sandal, N.; Bek, A.S.; Madsen, L.H.; Jurkiewicz, A.; Nielsen, M.W.; Trichine, L.; Stougaard, J. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 1385–1395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Pasternak, Y.; Kircher, S.; Palme, K. Estimation of differential cell cycle kinetics in higher plant root meristem with cellular fate and positional resolution. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
96. Fåhræus, G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **1957**, *16*, 374–381. [[CrossRef](#)]
97. Peng, H.; Ruan, Z.; Long, F.; Simpson, J.H.; Myers, E.W. V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 348–353. [[CrossRef](#)]