



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión y análisis funcional de receptores de factores Nod en arroz

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ALMA ROSA ALTÚZAR MOLINA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Pallavolu Maheswara Reddy
The Energy and Resources Institute, India Habitat Centre,
Lodi Road, New Delhi 110003, India

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Miguel Lara Flores
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Federico E. Sánchez Rodríguez[†]
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2021



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.

Dedicatoria

“Porque tú, oh Señor Jehová, eres mi esperanza: seguridad mía desde mi juventud. Por ti he sido sustentado desde el vientre: de las entrañas de mi madre tú fuiste el que me sacaste: de ti será siempre mi alabanza.”

Salmo 71: 5-6

**A mi familia,
Rafael Monribot A. y Juan Luis Monribot V.**

**A mis padres,
Jorge Altúzar y Martha Molina**

**A mi suegra,
Eréndira Villanueva**

Gracias, gracias, gracias

Agradecimientos

Este proyecto se realizó en el Departamento de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), UNAM, con la dirección del Dr. Pallavolu Maheswara Reddy, adscrito en ese momento en el CCG y los Dres. Miguel Lara Flores y Federico E. Sánchez Rodríguez[†], del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM, como integrantes del Comité Tutorial.

Se reconoce el apoyo de los integrantes del Jurado de Evaluación en la revisión de la tesis a los Dres. Agustín López Munguía Canales, Rosana Sánchez López, María de Lourdes Girard Cuesy, Gladys Iliana Cassab López y Sergio Manuel Encarnación Guevara.

El financiamiento para la realización de este trabajo fue otorgado por CONACYT-México (128135) y DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN206208) a P.M. Reddy. Beca de posgrado CONACYT (204969) a A.R. Altúzar-Molina. Se agradece al Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para participar en el XIV Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y 7º. Simposium México-USA, Campeche, 2011.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular al Instituto de Biotecnología, UNAM por brindarme la oportunidad de realizar y concluir mis estudios de Doctorado.

Durante el desarrollo de este proyecto se recibieron valiosas recomendaciones por parte de: Dra. Georgina Hernández Delgado (CCG, UNAM), Dra. Carmen Quinto (IBT, UNAM), Dra. Sonia Silvente K. (CCG, UNAM), Dra. Svetlana Shiskova (IBT, UNAM), Dr. Luis Cárdenas (IBT, UNAM), Dr. Jesús Arellano (CCG, UNAM) y Dr. Mario Ramírez (CCG, UNAM). Se contó con apoyo técnico de

la Biol. Lourdes Martínez Aguilar, Biol. Víctor M. Bustos Z. y la asistencia administrativa de la Sra. María Antonieta Santos.

Se agradece a los Dres. P.H.D. Schunmann (CSIRO Plant Industry, Australia) por proveer los vectores pUbi-tm1 y pWActGus, T. Tzifira (Universidad de Michigan, EUA) por donar los vectores pSAT-RCS2-Hpt, D.J. Gage (Universidad de Connecticut, EUA) por donar el vector pDG77, Luis Cárdenas (Instituto de Biotecnología, UNAM, México) por proveer pMP04, W.J. Broughtn y X. Perret (LBMPS, Universidad de Ginebra, Suiza) por proveer las cepas rizobiales. A la Biol. Olivia Santana y Dr. Luis Cardenas (Instituto de Biotecnología, UNAM) por su dirección en el aislamiento de los factores Nod, y a la M.C. Anjulata Singh (The Energy and Resources Institute, India) por apoyar en la determinación de la orientación de las construcciones en el vector PhL. A la Q.F.B. Xochitl Alvarado del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (UNAM).

A todos mis amigos del Departamento de Genómica Funcional de Eucariotes del CCG, que me acompañaron durante mi estancia en Cuernavaca: a Marlene Ortiz, Rigoberto Medina, Mariana López, Lourdes Velázquez, Lourdes Martínez, Bárbara Nova, Sara Fuentes, Sra. Silvia Trujillo, Víctor Bustos, Mario Ramírez, Maru Santos, Adriana Salazar, a todos, mil gracias.

Contenido

Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1 Asociación simbiótica leguminosa-rizobia	9
1.2 Percepción de factores Nod y transducción de señales tempranas de la nodulación en leguminosas	12
2. Antecedentes	17
2.1 Anatomía de las raíces de arroz y colonización rizobial	17
2.2 Potencial genético del arroz para interactuar simbióticamente con rizobios...	20
2.3 Señalización de la percepción de factores Nod y oligómeros de quitina en arroz...	22
3. Hipótesis y objetivos	26
Hipótesis	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
4. Estrategia experimental	27
4.1 Construcción de los vectores de transformación que contienen los genes que codifican proteínas involucradas en la percepción de factores Nod en leguminosas (MtLYK3, MtNFP, MtDMI2, LjLNP, MtSYMREM)	27
4.2 Obtención de plantas transformadas de arroz conteniendo los genes codificantes de los receptores de factores Nod provenientes de leguminosas	30
4.2.1 Transformación de callos de arroz y regeneración de plantas	
4.2.2 Confirmación de la expresión de los transgenes en las plantas transformadas de arroz	34
4.2.3 Determinación del número de copias de los transgenes y las líneas transgénicas provenientes de eventos de transformación independientes	35

4.3	Evaluación de la respuesta de las raíces transformadas de arroz a las señales rizobiales: Inoculación con rizobacterias y tratamientos con factores Nod.....	35
4.3.1	Evaluación del fenotipo de las plantas transformadas F0 y F1.....	35
4.3.2	Evaluación de la funcionalidad del promotor de la nodulina ENOD11 fusionado a Gus en leguminosas y plantas transformadas de arroz	35
4.3.3	Respuesta de las raíces transformadas de arroz a la inoculación con las cepas <i>S. meliloti</i> 1021 y <i>S. fredii</i> NGR234	37
4.3.4	Respuesta de las raíces de arroz al tratamiento con factores Nod provenientes de las cepas <i>S. meliloti</i> 1021 y <i>S. fredii</i> NGR234	37
4.3.5	Análisis transcriptómico de las plantas transformadas de arroz en respuesta al tratamiento con factores Nod	39
4.3.6	Validación de los datos transcriptómicos por amplificación en tiempo real (RT-qPCR)	40
4.3.7	Evaluación de la actividad nitrogenasa en raíces inoculadas con rizobios.....	41
5.	Resultados	42
5.1	Construcción de los vectores de transformación conteniendo genes marcadores y los genes de leguminosas	42
5.2	Obtención de plantas de arroz transformadas, expresión de los transgenes y determinación del número de copias	42
5.3	Fenotipo de las plantas transformadas de arroz y su respuesta a las señales rizobiales	45
5.3.1	Fenotipo de las plantas transformadas de arroz.....	45
5.3.2	Evaluación de la actividad de E11P-Gus en plantas de frijol y arroz	50
5.3.3	Respuesta de las plantas de arroz a inoculaciones con bacterias rizobiales.....	51
5.3.4	Respuesta de las raíces de leguminosas y de arroz al tratamiento con factores de nodulación	53
5.3.5	Análisis de la expresión de genes en respuesta a factores Nod	57
5.3.6	Validación de la expresión de genes específicos en respuesta a factores Nod por amplificación en tiempo real	62

5.3.7	Evaluación de la actividad nitrogenasa en raíces de arroz inoculadas con bacterias rizobiales	64
6.	Discusión	65
7.	Conclusión	70
8.	Perspectivas	71
9.	Referencias	73
	Anexo I. Construcción de los vectores de transformación (RCS2) con los diferentes casetes de expresión	86
	Anexo II. Artículo de divulgación	104
	Anexo III. Artículo científico	109

Índice de figuras

Fig. 1	Representación del proceso de formación de un nódulo fijador de nitrógeno.....	10
Fig. 2	Estructura general de los factores de nodulación	11
Fig. 3	Esquema representativo de la vía de transducción de señales activada por la percepción de factores Nod en leguminosas.....	15
Fig. 4	Anatomía de las raíces de arroz.....	18
Fig. 5	Proceso de obtención de plantas transformadas de arroz por biobalística.....	33
Fig. 6.	Expresión de los transgenes en plantas transformadas de arroz.....	44
Fig. 7	Comparación fenotípica entre plantas de arroz silvestres y plantas transformadas.....	45
Fig. 8	Fenotipo de hojas, panículas, flores y base de los tallos de las plantas silvestres y transformadas.....	46
Fig. 9	Fenotipo de raíces de plantas de arroz transformadas.....	47
Fig. 10	Fenotipo de los tallos de plantas de arroz silvestres y transformadas.....	48
Fig. 11	Panículas con semillas y porcentaje de formación de semillas en plantas de arroz T2.....	49
Fig. 12	Actividad de Gus en raíces de frijol cv. Negro Jamapa.....	50
Fig. 13	Colonización rizobial en la base de las raíces laterales y pelos radicales de plantas transformadas de arroz.....	51
Fig. 14	Colonización rizobial en raíces de arroz de plantas transformadas de arroz.....	52
Fig. 15	Respuesta de los pelos radicales en plantas control RMh y plantas PhL a la inoculación con bacterias rizobiales.....	53

Fig. 16	Deformación de los pelos radicales de <i>M. sativa</i> en respuesta a los factores Nod.....	54
Fig. 17	Deformación de los pelos radicales de raíces de arroz en respuesta al tratamiento con factores Nod.....	55
Fig. 18	Porcentaje de los pelos radicales deformes de la raíz principal de plantas tratadas con factores Nod.....	56
Fig. 19	Análisis por RNA-seq de raíces de arroz tratadas con factores Nod.....	58
Fig. 20	Diagrama de MapMan 3.5 que muestra los genes diferencialmente expresados en raíces RMh y PhL tratadas o no con factores Nod.....	60
Fig. 21	Análisis KEGG de las vías de señalización afectadas en las raíces de plantas RMh y PhL tratadas o no con factores Nod.....	61
Fig. 22	Validación de los perfiles de expresión de genes por RT-qPCR.....	63

Índice de cuadros

Cuadro 1	Genes de <i>M. truncatula/L. japonicus</i> que participan en la señalización temprana de la nodulación y sus homólogos en arroz.....	21
Cuadro 2	Oligonucleótidos usados para la amplificación de las secuencias codificantes de los genes <i>MtLYK3</i> , <i>MtNFP</i> , <i>MtDMI2</i> , <i>MtSYMREM</i> , y <i>LjLNP</i> provenientes de leguminosas, los genes marcadores, y promotores y adaptadores.....	28
Cuadro 3	Construcción de vectores de transformación de plantas basados en el sistema pSAT-RCS2-HPT	30
Cuadro 4	Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los transgenes de las plantas putativamente transformadas.....	34
Cuadro 5	Secuencias de los oligonucleótidos usados para la validación de genes por RT-qPCR.....	40
Cuadro 6	Plantas transformadas con los genes señalizadores de la percepción de factores Nod y sensores de ROS y Ca ²⁺	43
Cuadro 7	Análisis comparativo del porcentaje de pelos radicales deformes en plantas de arroz en respuesta al tratamiento con factores de nodulación.....	56

Resumen

La demanda en la producción mundial de cereales va en aumento y es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno asimilable a las plantas. Para cubrir el requerimiento de nitrógeno se han aplicado cantidades excesivas de fertilizantes nitrogenados, que de forma colateral han contribuido en el deterioro ambiental y en la salud humana. El arroz puede interaccionar simbióticamente con el hongo micorriza y algunos de los genes que participan en el desarrollo de esta simbiosis son comunes para la simbiosis leguminosa-rizobia. Una alternativa para suplir el nitrógeno a los cereales es establecer la fijación biológica de nitrógeno mediante la complementación de la vía de señalización simbiótica con genes esenciales para la nodulación. Los receptores de factores Nod (lipoquitooligosacáridos bacteriales), esenciales para el reconocimiento específico de las señales rizobiales y el inicio de la señalización simbiótica, son poco conservados en arroz. En este trabajo se presentan los resultados de la expresión de los genes *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM1* y *LjLNP* que participan en la etapa inicial del reconocimiento bacteriano. La expresión de los receptores de factores Nod en plantas de arroz no incrementó la colonización rizobial en las raíces de arroz, pero mostró las primeras señales de deformación en los pelos radicales, una de las respuestas iniciales observadas en la interacción leguminosa-rizobia y evidenció la inducción diferencial de genes de defensa en respuesta a factores de nodulación.

Abstract

Demand in world cereal production is increasing and dependent on the availability of nitrogen assimilable to plants. To cover the nitrogen requirement, excessive amounts of nitrogen fertilizers have been applied, which collaterally contributed to environmental and human health deterioration. Rice is capable of interacting symbiotically with mycorrhizal fungus and some of the genes involved in the development of this symbiosis are common for legume-rhizobia symbiosis. An alternative to supply nitrogen to cereals is to establish the biological nitrogen fixation by complementing the symbiotic signaling pathway with genes essential for nodulation. Nod factor (bacterial lipochitooligosaccharides) receptors, essential for the specific recognition of rhizobia signals and the beginning of the symbiotic signaling, are poorly conserved in rice. Here, I present the expression of *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM1* and *LjLNP* genes, which participate in the early stage of bacterial recognition. The expression of Nod factor receptors in rice plants did not increase rhizobia colonization in rice roots, but showed the first signs of root hair deformation, one of the initial responses observed in the legume: rhizobia interaction and evidenced the differential induction of defense genes in response to nodulation factors.

1. Introducción

El arroz es el alimento básico más importante para más de tres mil millones de personas en Asia, América Latina y África (Muthayya et al., 2014). El incremento en la población mundial concomitantemente genera la necesidad de aumentar la producción de arroz; sin embargo, tal aumento está limitado principalmente por la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Ladha et al., 2005). En las últimas décadas, los productores de arroz han incrementado la utilización de fertilizantes químicos como fuente de nitrógeno, lo que incrementa la producción, pero representa un alto costo económico y ha contribuido enormemente al deterioro ambiental (Reddy et al., 1997; Ladha y Reddy, 2000; Reddy y Ladha, 2000). Una estrategia altamente atractiva para suplir la fuente de nitrógeno en cereales es establecer el sistema de fijación biológica de nitrógeno que sucede naturalmente entre plantas leguminosas y bacterias rizobiales (Reddy et al., 2013; Oldroyd y Dixon, 2014). En esta asociación simbiótica, la planta provee una fuente de carbono a las bacterias y a cambio, las bacterias fijan nitrógeno ambiental asimilable a la planta (Oldroyd et al., 2011).

1.1 Asociación simbiótica leguminosa-rizobia

Las leguminosas son capaces de formar asociaciones simbióticas con bacterias rizobiales en estructuras denominadas nódulos, los cuales se forman por medio de una serie de cambios en ambos organismos e involucra la expresión regulada de genes específicos (Oldroyd y Downie, 2004; Jones et al., 2007). La interacción molecular entre los organismos simbióticos es iniciada por los flavonoides secretados por la planta y los factores de nodulación o factores Nod (lipoquitoligosacáridos) producidos por rizobia (Dénarié et al., 1996; Figura 1).

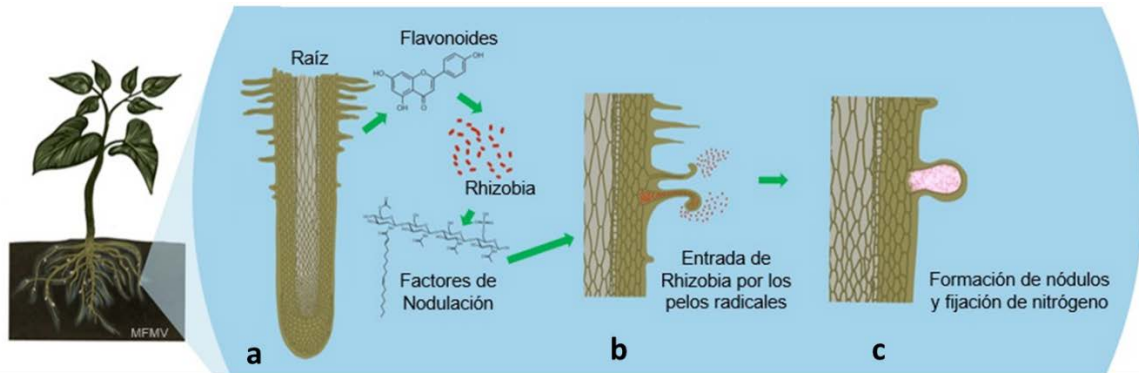


Fig. 1 Representación del proceso de formación de un nódulo fijador de nitrógeno. a) Las plantas leguminosas carentes de nitrógeno secretan, a través de sus raíces, compuestos flavonoides que son percibidos por bacterias rizobiales presentes en la rizósfera. Los flavonoides activan la producción de factores Nod en la bacteria. b) Los factores Nod son reconocidos específicamente por receptores tipo cinasas presentes en las membranas de los pelos radicales de la planta e inician la señalización temprana de la nodulación. La deformación y enrollamiento del pelo radical y la formación del hilo de infección permiten atrapar a las bacterias rizobiales y avanzar hasta la corteza de la raíz, en donde, simultáneamente ha ocurrido la división de células corticales y la formación de un primordio nodular. c) Las bacterias son liberadas al primordio nodular, donde son aisladas por membranas vegetales y dentro del nódulo maduro finalmente se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Figura modificada de Altúzar-Molina et al. (2018).

Los flavonoides secretados por la planta hospedera se enlazan y activan a las proteínas nodD bacteriales, que consecutivamente inducen la expresión de genes *nod* en rizobia relacionados con la producción de factores Nod (Liu y Murray, 2016). Los factores Nod consisten en 4 o 5 residuos de N-acetilglucosamina con un grupo acilo enlazado al residuo terminal no reductor (Dénarié et al., 1996). La especificidad de los factores Nod está dada por diversas modificaciones en su estructura, entre las que se incluyen la adición de grupos fucosilo, sulfurilo, acetilo, metilo, carbamoilo y arabinosilo, así como diferencias en la longitud y el número de insaturaciones del grupo acilo (Jones et al., 2007; Oldroyd y Downie, 2008; Figura 2).

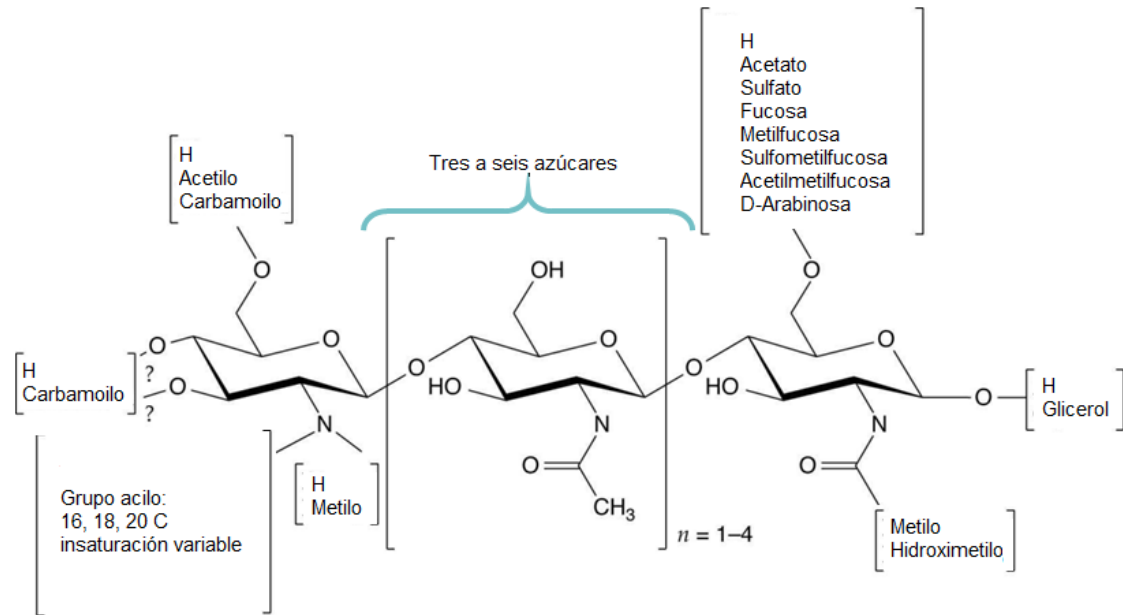


Fig. 2. Estructura general de los factores de nodulación (factores Nod) mostrando las posiciones en donde pueden presentar las modificaciones que determinan el tipo de hospedero aceptador (Figura modificada de Long, 1996).

La percepción de los factores Nod en los pelos radicales inicia múltiples respuestas que son esenciales para permitir la entrada de la bacteria a la planta hospedera. Inicialmente, en el pelo radical se observa un incremento en el calcio intracelular, la depolarización de la membrana provocada por el flujo de iones Cl^- , K^+ y Ca^{2+} , así como un incremento temprano de especies reactivas de oxígeno (Miwa et al., 2006; Cárdenas et al., 2000, 2008); enseguida, oscilaciones de calcio ocurren en la región perinuclear, el citoesqueleto es modificado y se induce la activación de genes codificantes de nodulinas tempranas (*ENOD*) (Geurts y Bisseling, 2002; Geurts et al., 2005). Posteriormente, la deformación y el enrollamiento del pelo de la raíz alrededor de rizobia permiten que la bacteria quede atrapada e inicie la formación del hilo de infección.

Simultáneamente, con el crecimiento del hilo de infección y conforme la bacteria avanza al interior del tejido epidermal, los factores Nod estimulan la división de las células de la corteza y la formación del primordio nodular. Luego, la bacteria

entra a las células primordiales por endocitosis, donde finalmente se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Limpens y Bisseling, 2003; Oldroyd y Downie, 2008; Figura 1).

1.2 Percepción de factores Nod y transducción de señales tempranas de la nodulación en leguminosas

La alta afinidad y especificidad con la cual los factores Nod son capaces de generar respuestas en la planta sugiere que la percepción de las señales bacteriales es mediada por la presencia de receptores. Los genes receptores de factores Nod se caracterizan por poseer un dominio extracelular con dos o tres motivos de Lisina (LysM), un dominio transmembranal y uno intracelular con actividad serina/treonina cinasa (Hirsch y Oldroyd, 2009) y, aunque existen otros receptores de características muy similares involucrados en la percepción de oligómeros de quitina, la señalización de la percepción de factores Nod logra separarse (Bozsoki et al., 2017). Genes receptores de factores Nod han sido reportados en diferentes leguminosas, por ejemplo *NFR1* y *NFR5* en *Lotus japonicus* (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003, 2007), *LYK3*, *LYK4* y *NFP* en *Medicago truncatula* (Figura 3; Ben Amor et al., 2003; Limpens et al., 2003; Arrighi et al., 2006) *SYM37* y *SYM10* en *Pisum sativum* (Zhukov et al., 2008; Dolgikh et al., 2011), y más ortólogos en otras leguminosas. Las mutaciones de pérdida de función en *MtNFP*, *PsSYM10*, *LjNFR1* y *LjNFR5* anulan por completo las respuestas inducidas por los factores Nod en la planta (Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006); sin embargo, el silenciamiento por RNAi de *MtLYK3* y *LYK4* no afectan las respuestas muy tempranas como la deformación del pelo radical, pero sí la formación del hilo de infección y toda la señalización consecuente (Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007; Figura 3).

Proteínas lectinas llamadas LNPs (Lectin Nucleotide Phosphohydrolases) también han sido involucradas en el reconocimiento de factores Nod (van Rhijn et al., 1998; Day et al., 2000). La inhibición de LNP en las raíces inhibe el flujo de calcio

en la punta del pelo radical, las oscilaciones de calcio perinucleares, la expresión de genes específicos de la nodulación y la formación del nódulo; pero, permite la deformación temprana del pelo radical en respuesta a los factores Nod, por lo que se sugiere participan inmediatamente después de la actividad de los receptores tipo cinasas (Etzler et al., 1999; Roberts et al., 2013). Debido a su afinidad de enlazamiento a carbohidratos se sugiere está involucrada en el reconocimiento de las bacterias rizobiales (Etzler et al., 1999).

La proteína remorina MtSYMREM1/LJSYMREM1 interacciona con los receptores cinasas LYK3/NFR1, NFP/NFR5 y SYMRK/DMI2 (Lefebvre et al., 2010; Toth et al., 2012). SYMREM1 y dos flotilinas FLOT2 y FLOT4 se expresan en la membrana plasmática y se sugiere sirven como proteínas de entamaje en microdominios lipídicos formando un complejo proteico de señalización específica de los factores Nod (Haney y Long, 2010; Toth et al., 2012). Experimentos de silenciamiento de *SYMREM1*, *FLOT2* y *FLOT4* han mostrado que son esenciales para el proceso de infección bacteriana (formación y elongación del hilo de infección) y durante el desarrollo del nódulo (Lefebvre et al., 2010; Haney y Long, 2010; Figura 3). Adicionalmente, estudios farmacológicos han sugerido la participación de enzimas fosfolipasas y proteínas G en la inducción de las oscilaciones de Ca^{2+} y la expresión de genes ENOD en respuesta a los factores Nod (Charron et al., 2004).

Otro tipo de receptor cinasa localizado en la membrana plasmática e involucrado en la señalización temprana de los factores Nod, pero posterior a LYK3/NFP, es esencial para la activación de las oscilaciones de calcio en respuesta a los factores Nod y para la expresión de los genes *ENOD*. Este receptor ha sido caracterizado en *P. sativum* (*PsSYM19*), *L. japonicus* (*LjSYMRK*), *M. sativa* (*MsNORK*), *Sesbania rostrata* (*SrSYMRK*) y *M. truncatula* (*MtDMI2*) (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002; Bersoult et al., 2005; Capoen et al., 2005). *SYMRK* es ampliamente distribuido en las plantas y es esencial para el desarrollo de la simbiosis con bacterias rizobiales, Frankia y micorriza arbuscular (Zhu et al., 2006;

Gherbi et al., 2008; Figura 3). El dominio intracelular de SYMRK está más conservado en las plantas que el dominio extracelular (EC) (Gherbi et al., 2008; Reddy et al., 2013). El dominio EC de SYMRK es variable entre leguminosas y muy diferente al que se presenta en monocotiledóneas, por ejemplo, *OsSYMRK* de arroz no presenta el dominio EC (Gherbi et al., 2008; Reddy et al., 2013). En leguminosas, el dominio extracelular de SYMRK presenta tres motivos ricos en leucina y aún se desconocen las moléculas ligando que potencialmente son reconocidas por este receptor (Zhu et al., 2008). El dominio cinasa intracelular de SYMRK interacciona con la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR1), relacionada con la síntesis de mevalonato, el cual es necesario para producir las oscilaciones de calcio y se ha sugerido como un segundo mensajero que transmite la información al núcleo (Kevei et al., 2007; Venkateshwaran et al., 2015).

La activación de las oscilaciones de calcio esenciales para la señalización de la nodulación está asociada al núcleo y depende de los canales iónicos *MtDMI1/PsSYM8/LjPOLLUX*, *LjCASTOR* (Ané et al., 2004; Charpentier et al., 2008) y de la bomba de calcio dependiente de ATP, *MCA8* (Capoen et al., 2011); en el caso de *L. japonicus* se han reportado que los componentes de nucleoporinas *LjNUP133*, *LjNUP85* y *NENA* también están involucrados en la regulación de almacenes intracelulares de calcio (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010).

La interpretación de las oscilaciones de calcio es realizada por la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina *MtDMI3/LjCCaMK/PsSYM9* que es regulada por calcio (Levy et al., 2004; Mitra et al., 2004; Miller et al., 2013). La activación de CCaMK enciende la cascada de señalización vía citocininas a través del receptor cinasa *MtCRE1/LjLHK1*, esencial para iniciar la división de células corticales (Tirichine et al., 2007; Plet et al., 2011), y activa la expresión de genes de la nodulación a través de los reguladores transcripcionales *NSP1* y *NSP2* (*Nodulation signaling Pathway 1 y 2*) y los factores *ERF* (*Ethylen Response Factors*)

ERN1, *ERN2* y *ERN3* que participan en la regulación de la expresión de genes de la nodulación (Hirsch y Oldroyd, 2009; Hirsch et al., 2009).

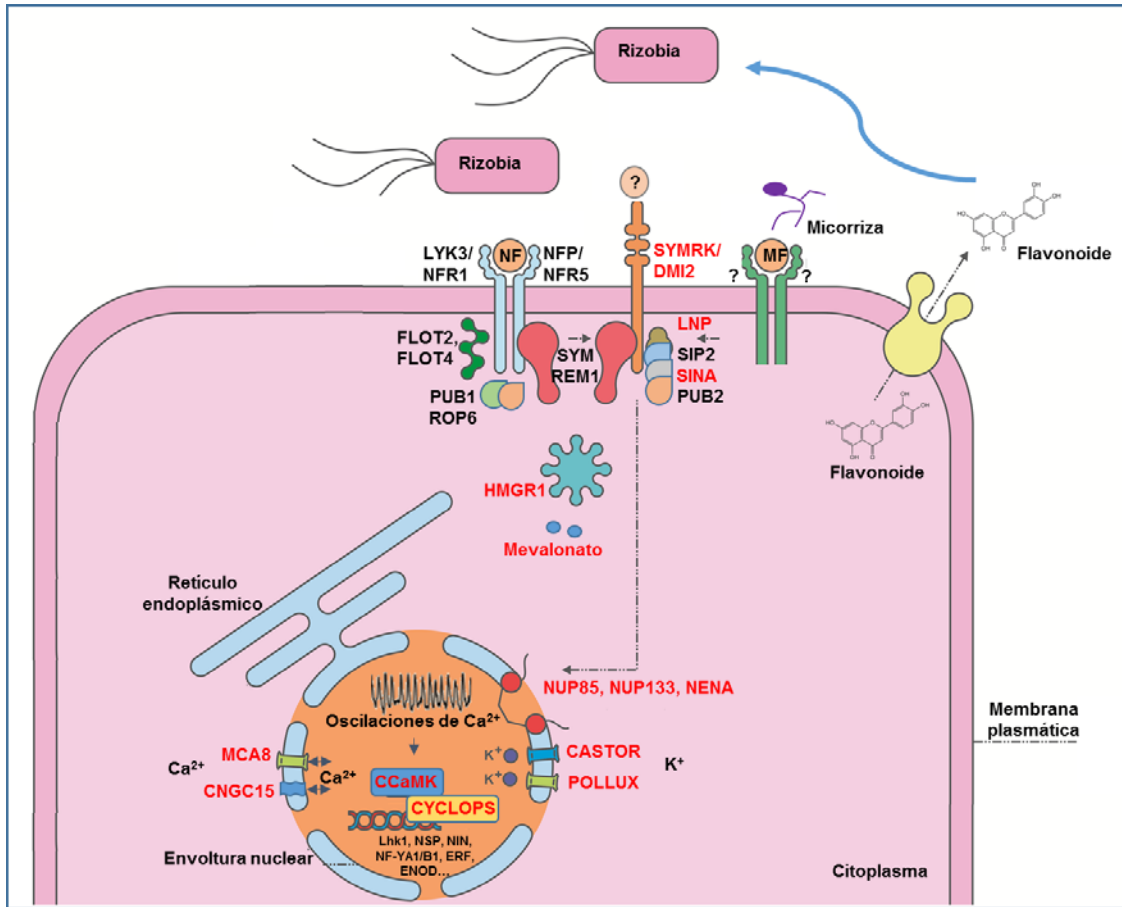


Fig. 3 Esquema representativo de la vía de transducción de señales activada por la percepción de factores Nod en leguminosas. Compuestos flavonoides son secretados de la raíz de la planta e inducen la producción de factores Nod en rizobia. Los factores Nod son percibidos por receptores de tipo cinasa *MtLYK3/LjNFR1*, *MtNFP/LjNFR5*, *MtDMI2/LjSYMRK*. LNP participa en el reconocimiento de rizobia posterior a LYK3/NFP. FLOT2, FLOT4 y SYMREM1 son proteínas de entamiasje que interactúan con los receptores cinasas. SYMRK interacciona con otras proteínas como SIP2 y HMGR1 que dirigen la señalización simbiótica hacia el núcleo. HMGR1 participa en la síntesis de Mevalonato, potencial segundo mensajero. *MtDMI1/LjPOLLUX*, *LjCASTOR*, *MCA8* y las nucleoporinas *NUP85*, *NUP133* y *NENA* participan en la activación de las oscilaciones de calcio que son interpretadas por *MtDMI3/LjCCaMK*, la cual interacciona con CYCLOPS e induce una cascada de activación de factores transcripcionales *NSP*, *ERF*, *NIN* y de nodulinas tempranas (ENOD). NF, siglas en inglés de Nod factor; MF, siglas en inglés de Mycorrhizal factor. Figura elaborada por Alma Altúzar y Mauricio Monribot.

Posteriormente, *CCaMK* fosforila al factor transcripcional *LjCYCLOPS/MtIPD3*, el cual es esencial para el desarrollo de la infección e induce una cascada de activación transcripcional para la división de las células corticales y el desarrollo del nódulo (Yano et al., 2008; Messinese et al., 2007; Singh et al., 2014). El factor transcripcional *CYCLOPS* activa la expresión del factor transcripcional *NIN* (*Nodule inception*) (Singh et al., 2014). Enseguida, *NIN* activa los factores transcripcionales de enlace a la caja CCAAT, complejo NF-Y (*Nuclear Factor Y*), que controlan la formación del primordio nodular; además, *NIN* es requerido para el desarrollo del hilo de infección (Soyano et al., 2013; Singh et al., 2014).

Las formas activas de *CCaMK*, *CYCLOPS* y del receptor de citocininas *LhK1* son suficientes para el desarrollo del nódulo, ya que en ausencia de bacterias rizobiales, las mutaciones de ganancia de función de estos genes indujeron la nodulación espontánea en leguminosas (Tirichine et al., 2006, 2007; Singh et al., 2014).

2. Antecedentes

Para suplir la demanda de nitrógeno en cereales como el arroz, el maíz y el trigo se ha propuesto investigar el establecimiento de la fijación biológica de nitrógeno mediante tres estrategias principales: 1) El uso incrementado de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, 2) la transferencia del complejo nitrogenasa a organelos celulares y, 3) la complementación de la vía de señalización de la fijación biológica de nitrógeno (Reddy et al., 2002; Beatty y Good, 2011). Este reto está siendo abordado por varios grupos de investigación internacionales y ha contado con apoyo financiero de la fundación Bill y Melinda Gates (Beatty y Good, 2011; Reddy et al., 2013; Oldroyd y Dixon, 2014; Burén y Rubio, 2018; Huisman y Geurts, 2020).

2.1 Anatomía de las raíces de arroz y colonización rizobial

Las raíces de arroz presentan un sistema radical fibroso característico de plantas monocotiledóneas (Morita y Nemoto, 1995; Hotchholdinger et al., 2004; Rebouillat et al., 2009; Rich y Watt, 2013). Con base en Rebouillat et al. (2009), la estructura de las raíces de arroz presenta cinco tipos de raíces a) radícula o raíz embrionaria primaria, b) raíces seminales o embrionarias secundarias, c) raíces adventicias nodales o de la corona post embrionaria, d) raíces laterales grandes y e) raíces laterales pequeñas. Recién germinada la semilla se observan la radícula primeramente, y luego, cinco raíces seminales gruesas y poco ramificadas (Figura 4a). Las raíces seminales son de corta duración, mientras que los demás tipos son permanentes. De las raíces embrionarias y adventicias nacen las raíces laterales grandes y pequeñas; las raíces laterales grandes responden al efecto de la gravedad y tienen crecimiento indeterminado, mientras que las raíces laterales pequeñas crecen lateralmente y tienen crecimiento determinado (Hotchholdinger et al., 2004; Rebouillat et al., 2009). Todas las raíces de arroz pueden presentar pelos radicales, que son prolongaciones de células epidermales llamadas tricoblastos (células epidermales cortas en arroz); los pelos radicales incrementan el área

superficial de la raíz y son esenciales para la absorción de agua y nutrientes (Morita y Nemoto, 1995; Rebouillat et al., 2009).

La anatomía radial de las raíces de arroz es influida por el sistema de cultivo. En los tipos de raíces se pueden encontrar, desde la periferia hacia el centro, la epidermis, la exodermis, el esclerénquima, la mesodermis y la endodermis, y el cilindro central o estela, en donde se encuentran el periciclo, los vasos del xilema y floema y la médula (Rebouillat et al., 2009; Figura 4b). El aérenquima, tejido encargado del intercambio de gases, se origina mediante muerte celular programada de las células de la mesodermis y está presente constitutivamente en todos los tipos de raíces de arroz (con excepción de las raíces laterales pequeñas), pero incrementa en suelos inundados o condiciones deficientes en O₂ (Yamauchi et al., 2020).

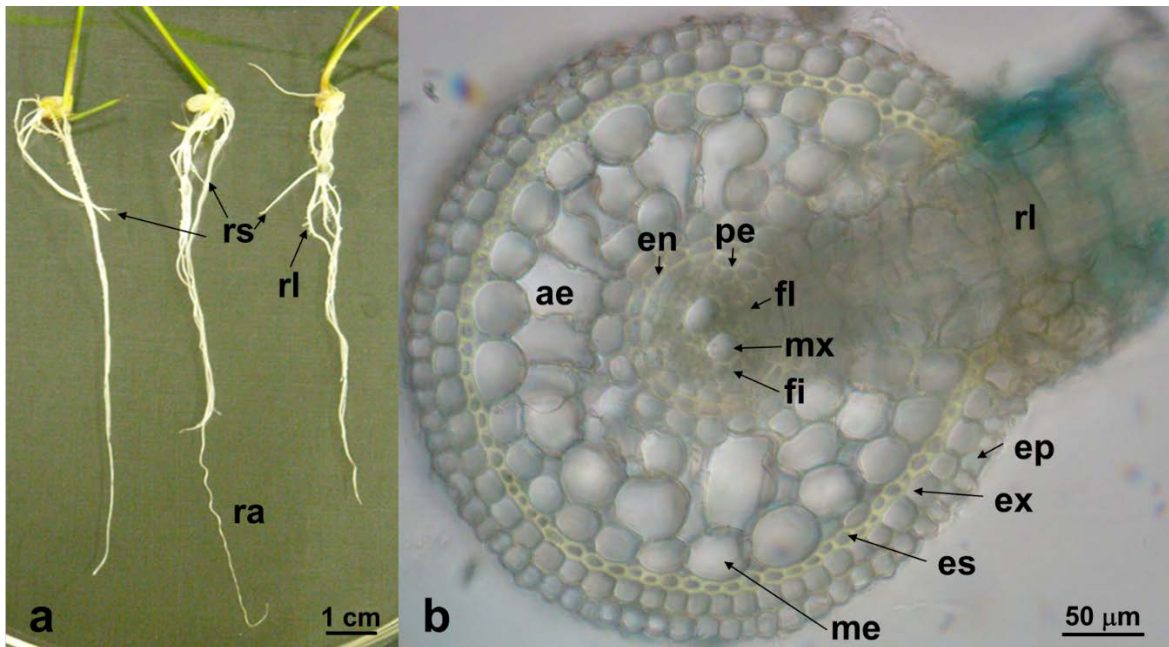


Fig. 4. Anatomía de las raíces de arroz. a) Raíces de plántulas de arroz (8 días post-emergencia) mostrando la radícula (ra), raíces seminales (rs) y raíces laterales (rl). b) corte transversal de la radícula que muestra la emergencia de una raíz lateral y la anatomía desde el exterior al centro: epidermis (ep), exodermis (ex), esclerénquima (es), mesodermis (me), aerénquima (ae), endodermis (en), periciclo (pe), floema (fl), metaxilema (mx) y la fibra (fi). Fotografías propias.

En las raíces de arroz se ha reportado una diversidad de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, entre ellas *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* (Yanni et al., 1997, 2001; Dazzo et al., 2000), *Bradyrhizobium* (Chaintreuil et al., 2000; Tan et al., 2001), *Azorhizobium* (Engelhard et al., 2000), entre otras cepas rizobiales (Tan et al., 2001; Perrine et al., 2007). Estudios sobre la interacción arroz-rizobia indican que un modo primario de invasión rizobial en las raíces de arroz es a través de heridas o fisuras en la epidermis ocasionadas por la emergencia de raíces laterales y que la colonización endofítica se restringe a espacios intercelulares (Reddy et al., 1997; Prayitno et al., 1999; Dazzo et al., 2000; Chaintreuil et al., 2000). Sin embargo, el proceso de infección observado por Reddy et al. (1997) fue independiente de los factores Nod, inespecífico y no indujo la deformación de los pelos radicales, ni la división de células corticales y tampoco el desarrollo del hilo de infección (Reddy et al., 1997). La entrada de los rizobios por la heridas de las raíces de arroz fue estimulada por agregar naringenina (Webster et al., 1997). Además, Sreevidya et al. (2005) demostraron que la expresión de las lectinas PSL y GS52 de chícharo y soya en arroz favoreció la entrada y colonización de rizobios en arroz.

La inducción de estructuras tipo nódulos o “hipertrofias” en raíces de arroz se logró con la inoculación con rizobios o tratadas con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por Ridge et al. (1993), pero la frecuencia de nódulos fue extremadamente baja (0.1-0.2%) y no se ha logrado observar nuevamente el fenotipo. Cepas rizobiales productoras de auxinas también han inducido la producción de pseudonódulos en raíces de arroz (Reddy et al., 1997).

El diálogo molecular entre leguminosa y las bacterias rizobiales inicia con la producción de flavonoides exudados por la raíz de la planta y que son reconocidos por la bacteria e inducen la producción de factores Nod (Dénarié et al., 1996; Liu y Murray, 2016). Reddy et al. (2000) indicaron que exudados de raíces de algunos cultivares específicos de arroz indujeron la expresión de genes *nod* de *Sinorhizobium* (Ensifer) *fredii* NGR234 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. La

expresión constitutiva de una isoflavona sintasa de soya en arroz confirió a las plantas la capacidad de producir flavonoides que indujeron la expresión de genes *Nod* de varias especies de rizobios (Sreevidya et al., 2006).

2.2 Potencial genético del arroz para interactuar simbióticamente con bacterias rizobiales

En los últimos veinte años se ha explorado el potencial del arroz para formar un sistema simbiótico con rizobios. Se han investigado qué genes de la vía de señalización de la nodulación se encuentran conservados y qué estrategias de ingeniería genética deben seguirse para complementar la vía de señalización y lograr la fijación biológica de nitrógeno en arroz (Reddy et al., 2013; Rogers y Oldroyd, 2014; Huisman y Geurts, 2020).

El arroz, aunque no desarrolla la asociación simbiótica con bacterias rizobiales, si lo hace con micorriza arbuscular (MA) (Reddy et al., 1997; Gutjahr et al., 2008). La simbiosis MA se da entre aproximadamente el 80% de las plantas terrestres con hongos del filo Glomeromycota y favorece la absorción de agua y nutrientes en las plantas y los hongos a cambio reciben fuentes de carbono (Parniske, 2008). La asociación de MA ha existido desde hace 400 millones de años y se ha sugerido que varios componentes de la señalización para el desarrollo de MA han sido reclutados para otros tipos de simbiosis (Parniske, 2008; Markmann y Parniske, 2009). Interesantemente, en leguminosas se ha encontrado a un grupo de genes que son requeridos para ambos procesos simbióticos planta-micorriza y leguminosa-rizobia: *SYMRK/DMI2*, *CASTOR*, *POLLUX/DMI1*, *CCaMK/DMI3*, *CYCLOPS*, *NUP85*, *NUP133*, *NENA*, *MCA8*, *HMGR1* (Parniske, 2008; Zhu et al., 2006), por lo que la presencia de esos elementos podrían aprovecharse para desarrollar la simbiosis con rizobia en arroz.

En arroz se han encontrado ortólogos de genes inducidos durante la nodulación como *MtDMI1*, *MtDMI2*, *MtDMI3*, *MtCRE1*, *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtNSP1*, *MtNSP2*, *MtNin* (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002) y varios genes *ENOD* (Kouchi et al., 1999; Reddy et al., 1998a, Reddy et al., 1999). El grado de conservación de estos genes en diferentes cultivares de arroz es variado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genes de *M. truncatula*/*L. japonicus* que participan en la señalización temprana de la nodulación y sus homólogos en arroz.

Gen	Fenotipo mutante en Lj/Mt		Ref.	Accesión	% de identidad con proteínas de <i>M. truncatula</i>	Complementación de mutantes Lj/Mt con homólogos de arroz		
	Nod	Mic				Mic	Nod	Ref.
<i>LjNFR1/MtLYK3</i>	-	+	1,2	AP004464	53			
<i>LjNFR5/MtNFP</i>	-	+	3,4	AK072207	39			
<i>LjSYMRK/MtDMI2</i>	-	-	5,6	AK099778	36	r	nr	24
<i>LjCASTOR</i>	-	-	7	AK068216	-	r	r	25, 26, 27
<i>LjPOLLUX/MtDMI1</i>	-	-	7,8	AK072312	63	nr	nr	25, 26, 27
<i>LjNUP85</i>	-	-	9	AK072636	-			
<i>LjNUP133</i>	-	-	10	AK073981	-			
<i>LjNENA</i>	-	-	11	NP001043597	-			
<i>LjCCaMK/MtDMI3</i>	-	-	12, 13, 14	AK070533	70	r	r	25, 26, 28
<i>LjCYCLOPS/MtIPD3</i>	-	-	15, 16	EF569223	46	r	r	26, 29, 30
<i>LjLHK/MtCRE1</i>	-	+	17, 18	BR000246	58			
<i>LjNSP1/MtNSP1</i>	-	+	19, 20	NT079921	41		r	31
<i>LjNSP2/MtNSP2</i>	-	+	19, 21	NT107191	46		r	31
<i>LjNIN/MtNIN</i>	-	+	22,23	AK100046	36		nr	31

Nod: nodulación, Mic: micorrización, (-): deficiente, (+): efectivo, r: restaurado, nr: no restaurado. 1. Radutoiu et al., 2003; 2. Limpens et al., 2003; 3. Madsen et al., 2003; 4. Arrighi et al., 2006; 5. Stracke et al., 2002; 6. Endre et al., 2002; 7. Imaizumi-Anraku et al., 2005; 8. Ané et al., 2004; 9. Saito et al., 2007; 10. Kanamori et al., 2006; 11. Groth et al., 2010; 12. Tirichine et al., 2006; 13. Lévy et al., 2004; 14. Mitra et al., 2004; 15. Yano et al., 2008; 16. Messinese et al., 2007; 17. Tirichine et al., 2007; 18. Gonzalez-Rizzo et al., 2006; 19. Heckmann et al., 2006; 20. Smit et al., 2005; 21. Kalo et al., 2005; 22. Schauser et al., 1999; 23. Marsh et al., 2007; 24. Markmann et al., 2008; 25. Banba et al., 2008; 26. Gutjahr et al., 2008; 27. Chen et al., 2009; 28. Chen et al., 2007; 29. Chen et al., 2008; 30. Yano et al., 2008; 31. Yokota et al., 2010. Cuadro modificado de Reddy et al., 2013.

Experimentos de complementación en leguminosas mutantes han mostrado que varios genes ortólogos/homólogos de arroz son funcionalmente activos para complementar el fenotipo de nodulación (Reddy et al., 2013; Cuadro 1). Los genes de arroz *CASTOR*, *CCaMK*, *CYCLOPS*, *NSP1*, *NSP2* recuperan ambas simbiosis

micorrización y nodulación en leguminosas mutantes, deficientes en esos mismos genes (Banba et al., 2008; Gutjahr et al., 2008; Chen et al., 2007, 2008, 2009; Yano et al., 2008). Por otro lado, la complementación con *SYMRK* solamente recupera la micorrización (Markmann et al., 2008); mientras que *POLLUX* y *NIN* no recuperan ninguna de las simbiosis en las leguminosas probadas (Banba et al., 2008; Gutjahr et al., 2008; Chen et al., 2009; Yokota et al., 2010).

Los receptores de factores Nod MtLYK3/LjNFR1 y MtNFP/LjNFR5 involucrados en la percepción de factores Nod en *M. truncatula* y *L. japonicus* (que funcionan previos a *CCaMK*) y los factores transcripcionales *NSP1*, *NSP2*, *ERN1* y *NIN* (involucrados en la señalización posterior a *CCaMK*) son poco conservados en arroz, por lo que una primera propuesta para la complementación de la vía de transducción de señales temprana de la nodulación en arroz incluye la expresión de los receptores de factores de Nodulación y posteriormente continuar con los factores transcripcionales.

2.3 Señalización de la percepción de factores Nod y oligómeros de quitina en arroz

El tratamiento con factores Nod de plantas transformadas con el promotor de *MtENOD12* fusionado al gen *GUS*, bajo condiciones limitantes de N₂, indujo la expresión de *MtENOD12-GUS* en las células corticales de la raíz, la endodermis y el periciclo, pero no en células epidermales, como sucede en leguminosas (Reddy et al., 1998b). La percepción parcial de los factores Nod sugiere que existe un programa de señalización incompleto y que la incapacidad de las células epidermales de responder a los factores Nod, como lo hacen la leguminosas, puede deberse a la ausencia de receptores que los perciban apropiadamente.

Los oligosacáridos de quitina son reconocidos como patrones moleculares asociados a microbios/patógenos (MAMP/PAMP) y activan la respuesta inmune de

la planta mediante la activación de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (Macho y Zipfel, 2014).

Existen más de 10 miembros de la familia de receptores tipo cinasas LysM-RLK en arroz (Zhang et al., 2007). El gen *OsCERK1* presenta un motivo LysM en el dominio extracelular y un dominio cinasa intracelular (Shimizu et al., 2010), y es esencial para la percepción/señalización de quitina, peptidoglucano y lipopolisacaridos (Desaki et al., 2006, 2018; Shimizu et al., 2010) y, para la interacción con MA (Miyata et al., 2014; Zhang et al., 2015). *CERK1* de *A. thaliana* percibe la señal de quitina por sí mismo y forma complejos homodiméricos (Liu et al., 2012); mientras que *OsCERK1* requiere del receptor *OsCEBIP* (Chitin Elicitor Binding Protein) para el reconocimiento del quitooligosacárido (Shimizu et al., 2010). *OsCEBIP* posee dos motivos LysM en su dominio extracelular (similar a los receptores de factores Nod MtLYK3 y MtNFP) y no posee dominio cinasa intracelular. *OsCEBIP* es capaz de reconocer fragmentos de quitina y es esencial para la señalización de la respuesta inmune (Kaku et al., 2006).

Como se ha mencionado previamente, el arroz es capaz de interactuar con micorriza arbuscular. Las señales producidas por MA son los factores Myc, quitooligosacáridos con estructura similar a la de los factores Nod (Maillet et al., 2011), y por quitooligosacáridos de cadena corta CO4/CO5 (Genre et al., 2013). El CO4 se enlaza y es reconocido por el receptor de factores Myc *OsMYR/OsLYK2* e induce la dimerización y fosforilación del complejo heterómero *OsMYR-OsCERK1*; mutantes en esos genes redujeron la colonización de MA en arroz y bloquean la expresión de genes marcadores de la micorrización (Zhang et al., 2015; He et al., 2019).

Los motivos YAQ/YAR presentes en el dominio cinasa del receptor *CERK1* de la mayoría de plantas mono y dicotiledóneas, pero ausente en *A. thaliana*, son esenciales para el desarrollo de interacciones simbióticas (Nakagawa et al., 2011;

De Mita et al., 2014). El dominio cinasa de *OsCERK1* de arroz, pero no el de *Brassica rapa* (de la familia Brasicaceae, igual que *A. thaliana*), pudo producir señalización simbiótica leguminosa-rizobia en *L. japonicus* cuando se expresó como un receptor quimérico con el dominio LysM de LjNFR1 (Miyata et al., 2014). Interesantemente, la expresión de las quimeras OsMYR1 y OsCERK1 con los ectodominios de MtNFP y MtLYK3, respectivamente, incrementó las oscilaciones de Ca²⁺ en respuesta a factores Nod en arroz y recuperó el fenotipo simbiótico en *M. truncatula* deficiente en nodulación (He et al., 2019).

LjNFR1 y LjNFR5 no participan en la señalización de quitina (Zhang et al., 2007); y, además de ser esenciales en la interacción simbiótica con los rizobios, estos genes se requieren también para la simbiosis micorrícica, pero no LjNFR5/MtNFP (Zhang et al., 2015). La expresión reducida de los ortólogos *PaNFP* y *SILYK10* en *Parasponia andersonii* Miquel (Urticales: Cannabaceae) y *Solanum lycopersicum* L. (Solanales: Solanaceae) (Op de Camp et al., 2011; Buendía et al., 2016) redujo también la colonización de MA. Lo anterior sugiere que receptores parcialmente homólogos pueden participar en la señalización simbiótica con los rizobios, MA o en la respuesta de defensa.

El dominio extracelular de los genes *OsCERK1* y *OsNFR5*, homólogos de los receptores *MtLYK3* y *MtNFP*, se encuentran pobremente conservados en arroz (Miyata et al., 2014, 2016; Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2006), lo que probablemente no permite el reconocimiento apropiado de los factores Nod (Cuadro 1).

Por todo lo anterior, se sugiere que al menos una porción del sistema de transducción de señales de la nodulación está presente en arroz y que la ausencia de receptores que perciban apropiadamente los factores Nod puede ser una de las razones de la incapacidad de las raíces de arroz para interactuar simbióticamente con rizobia.

Este trabajo ampliará nuestro conocimiento acerca de la susceptibilidad del arroz para interactuar simbióticamente con rizobios, ya que pese a todos los factores que favorecen esta asociación, la ausencia de respuestas morfológicas típicas en respuesta a las señales de nodulación aún es consistente. Específicamente, la incorporación de los genes involucrados en la percepción de las señales de nodulación establecerá las bases para el ensamble del sistema de fijación simbiótica de nitrógeno en arroz.

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La expresión de receptores de factores Nod en arroz facilitará el reconocimiento específico de las señales de nodulación y activará la vía de transducción de señales necesaria para promover la respuesta simbiótica en las raíces de arroz.

Objetivo general

Evaluar la capacidad de las raíces de arroz, transformadas con receptores de factores Nod, de reconocer y responder a las señales rizobiales.

Objetivos específicos

- 1 Construir vectores de transformación que contengan genes codificantes de proteínas involucradas en la percepción de factores Nod en leguminosas (*MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *LjLNP*, *MtSYMREM*).
- 2 Obtener plantas transformadas de arroz conteniendo los genes codificantes de los receptores de factores Nod provenientes de leguminosas.
- 3 Evaluar la respuesta de las raíces transformadas de arroz a las señales rizobiales: Inoculación con rizobacterias y tratamientos con factores Nod.

4. Estrategia experimental

4.1 Construcción de los vectores de transformación que contienen los genes que codifican proteínas involucradas en la percepción de factores Nod en leguminosas (*MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *LjLNP*, *MtSYMREM*).

Los genes involucrados en la señalización temprana de factores Nod como *LYK3*, *NFP*, *DMI2*, *SYMREM* y *LNP* son pobremente conservados en arroz (Reddy et al., 2013), por lo que se decidió expresar estos genes, como uno de los primeros pasos para el reconocimiento de bacterias rizobiales e inicio de la complementación de la vía de señalización de la fijación biológica de nitrógeno en arroz. Las secuencias codificantes de *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM*, y *LjLNP* se obtuvieron con oligonucleótidos específicos (Cuadro 2) diseñados con base en las secuencias de los mRNA disponibles en bases de datos públicas (NCBI) y usando muestras de cADN preparado de ARN total aislado de raíces de *M. truncatula* A17 o, en el caso de *LjLNP*, de raíces de *Lotus japonicus* MG-20. Todos los genes se clonaron inicialmente en el vector pGEM-T Easy (pGEMTE; Promega, Madison, EUA) y su secuencia fue verificada para confirmar su identidad.

Después de digestiones enzimáticas apropiadas (ver detalles en Anexo 1), las secuencias codificantes de los genes *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM*, y *LjLNP* se ligaron a los promotores constitutivos de los genes: Actina de arroz (OsActP), Ubiquitina de maíz (ZmUbiP), Citocromo C de arroz (OsCc1P), Manosina sintasa (MasP) y el promotor específico de raíces de arroz OsRcg2P, respectivamente. Estos promotores ya se han utilizado previamente en la generación de plantas transgénicas de arroz u otras monocotiledóneas y muestran distintos niveles de actividad dependiendo del tejido de la planta (Buchholz et al., 1996; Christensen et al., 1992; McElroy et al., 1990; Jang et al., 2002).

Cuadro 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación de las secuencias codificantes de los genes *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM*, y *LjLNP* provenientes de leguminosas, los genes marcadores, y promotores y adaptadores.

Gen	Secuencias de los oligonucleótidos
Genes provenientes de leguminosas	
<i>MtNFP</i> (DQ496250.1)	5'-F: <u>AGATCTATGTCTGCCTTCTTTCTTCCTTCTAG</u> 3'-R: <u>GGTACCTTAACGAGCTATTACAGAAGTAACAAC</u>
<i>MtLYK3</i> (AY372406.1)	5'-F: <u>GAGCTCATGAATCTCAAAAAATGGATTAC</u> 3'-R: <u>ACTAGTTCATCTAGTTGACAACAGATTTATG</u>
<i>MtSYMREM1</i> (JQ061257.1)	5'-F: <u>AGATCTGCTGTAACCCCTAGAGATACATTATGG</u> 3'-R: <u>CCCGGGCTAACTGAAAAACCTTAAACCGCTGA</u>
<i>LjLNP</i> (AF156780.1)	5'-F: <u>CTCGAGGCATTGGACTAAAGCCATGG</u> 3'-R: <u>CCCGGGCAGGCTTAAGCAGGTAAGTAGTA</u>
<i>MtDMI2</i> (XM_003612902.3)	5'-F: <u>GAGCTCGTCGACTATCTTTCAGATAATGATGGAG</u> 3'-R: <u>TGCCCCGGGTACCATTTCATGCATTTACTATCTCGG</u>
Genes marcadores	
<i>Hpt</i>	5'-F: ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCG 3'-R: CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT
<i>Gus</i>	5'-F: GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3'-R: GTGACATCGGCTTCAAATGGC
<i>Cameleon 3.6</i>	5'-F: TGAAGTTCATCTGCACCAC 3'-R: TTCCATTGCCATCAGCATC
<i>HyPer</i>	5'-F: CCGCTGCACATTGGTTTGATTC 3'-R: TGAAGTTCATCTGCACCAC
Promotores	
ZmUbi-MCS	5'-F: TTGGATCCTAACTAGTTAACCCTGGGTAAGGTACCTT
WAct-MCS	5'-F: ACGCGTCTGACTGATCTAGATAGCCCGGGTAGACTAGTTAGGGTACCCTAA
Adaptador Age I/Bgl II	5'-F: CCGGTCTCCAGTGACATA
<i>OsACT1</i> (LOC_Os03g50885.1)	5'-F: AGCATACTCGAGGTCATTCATATG 3'-R: CTCCATGGGTCTGACTCTACCTACAAAAAAGCTCCGCACG
<i>OsRCg2</i> (LOC_Os10g40430.1)	5'-F: ACCGGTCTGCAGCTGATCTCAACAGT 3'-R: CTCGAGGGATGCAGCTAGCGAGCTAGTGAT
<i>OsCc1</i>	5'-F: CGACAGATCTGCGCCAGGTAAGTCCGACC 3'-R: TTAATGAGCTCCGCGCCGCGCGAGAA
<i>ENOD11</i>	5'-F: GCGCGAAGCTTAGACACTTAAATTTGAGGGTC 3'-R: AGAGCCCGGGTTTAGGTAGTGATTTTAGTGTGC

Nota: Los promotores de Manopina sintasa (Mas) y 35SCaMV se cortaron usando Age I y Bgl II de los vectores auxiliares pSAT3A y pSAT4A, respectivamente (Chung et al., 2005). Los fragmentos subrayados indican sitios de restricción incluidos en los oligonucleótidos para permitir la clonación del DNA de interés.

El gen de la higromicina-fosfotransferasa (*Hpt*) fusionado al promotor de la octopina sintasa (OcsP) (Dekeyser et al., 1989) se utilizó como marcador de resistencia de los tejidos transformados.

Adicionalmente, se realizaron construcciones conteniendo genes sensores de Calcio (*Cameleon3.6*; Miwa et al., 2006) y de especies reactivas de oxígeno (*HyPer*; Belousov et al., 2006; Choi et al., 2012) fusionados al promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor (35SCaMV) (Odell et al., 1985). Con la finalidad de evaluar la actividad de la nodulina temprana *ENOD11* en respuesta a los factores Nod, también se construyeron vectores que contenían la secuencia codificante del gen *Gus* controlado por el promotor de *ENOD11* (con base en Marsh et al., 2007). Todos los genes y promotores se secuenciaron para confirmar su identidad.

Los vectores de transformación se construyeron a través de múltiples rondas de clonación usando técnicas recombinantes estándar (Sambrook et al., 1989; ver detalles en Anexo I). Los casetes de expresión se construyeron y clonaron en vectores intermediarios pSAT y finalmente se ensamblaron, en diferentes combinaciones, en vectores de transformación de plantas basados en el sistema pSAT-RCS2-HPT para la expresión de múltiples genes (Chung et al. 2005; Anexo 1; Cuadro 3).

Cuadro 3. Construcción de vectores de transformación de plantas basados en el sistema pSAT-RCS2-HPT y que contienen los genes *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtDMI2*, *MtSYMREM*, y *LjLNP*, así como los genes marcadores en diferentes combinaciones.

No.	Nombre	Contiene	Tamaño (kb)
1	RMh	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i>	2.2
2	RMheG	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i>	4.8
3	RheHP	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35sP-HyPer-35sT</i>	7.1
4	RheCM	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35sP-Cameleon3.6-35sT</i>	8.0
5	PhL	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i>	14.66
6	J5hL	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i> , <i>OsCc1P-DMI2-AgsT</i>	19.46
7	PhLeGHP	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35SP-HyPer-35ST</i>	19.56
8	PhLeGCM	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35SP-Cameleon3.6-35ST</i>	20.46
9	J5hLeGHP	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i> , <i>AtActP-DMI2-NosT</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35SP-HyPer-35ST</i>	24.36
10	J5hLeGCM	<i>OcsP-Hpt-OcsT</i> , <i>Rcg2P-LjLNP-Rcg2T</i> , <i>OsActP-LYK3-NosT</i> , <i>MasP-MtSYMREM-MasT</i> , <i>ZmUbiP-NFP-Tm1</i> , <i>AtActP-DMI2-NosT</i> , <i>MtE11P-GUS-NosT</i> , <i>35SP-Cameleon3.6-35ST</i> .	25.26

Nota: El tamaño representa la longitud de los casetes génicos, sin incluir la del vector pRCS2 (7 kb).

4.2 Obtención de plantas transformadas de arroz conteniendo los genes codificantes de los receptores de factores de Nod provenientes de leguminosas.

4.2.1 Transformación de callos de arroz y regeneración de plantas

El procedimiento de obtención de plantas transformadas de arroz vía consistió en las siguientes etapas (Figura 5):

- Esterilización de semillas: se esterilizaron semillas de arroz *Oryza sativa* cv. Murazaki de acuerdo con Sreevidya et al. (2005). Para ello las semillas se lavaron primero con etanol al 70% durante 1 minuto, se enjuagaron con agua estéril, luego se desinfectaron con cloro comercial al 20% durante una hora y enjuagaron con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro.

- Inducción de callo: Las semillas desinfectadas se colocaron en medio MS4D preparado con sales Murashige y Skoog (MS, M5524; Sigma Aldrich) 4.3 g/L, Vitaminas MS (M3900; Sigma Aldrich) 1X, casaaminoácidos 300 mg/L, prolina 2.88 g/L, 2,4-D 2 mg/L, sacarosa 30 g/L, agar 0.8% con un pH de 5.8. La formación de callos celulares se realizó durante tres semanas a 28-30 °C, 55% de humedad relativa (HR) y luz continua.

-Subcultivo: Los callos embriogénicos de tres semanas se dividieron en pequeñas piezas y transfirieron a medio N6D preparado con sales MS (M5524) 4.3 g/L, vitaminas MS (M3900) 1X, casaaminoácidos 300 mg/L, prolina 2.88 g/L, 2,4.D 2 mg/L, sacarosa 30 g/L, agar 0.8%, pH 5.8. En este medio, los callos se mantuvieron durante una semana a 28-30 °C, 55% de HR y luz continua.

- Precultivo: Los callos embriogénicos se transfirieron a medio ND2 preparado con KNO₃ 2.83 g/L, MgSO₄ 185 mg/L, MnSO₄.4H₂O 4.4 mg/L, ZnSO₄.7H₂O 1.5 mg/L, (NH₄)₂SO₄ 463 mg/L, KH₂PO₄ 400 mg/L, KI 0.8 mg/L, HBO₃ 1.6 mg/L, CaCl₂.2H₂O 166 mg/L, FeSO₄.7H₂O 27.8 mg/L, Na₂EDTA 37.7 mg/L, ácido nicotínico 0.5 mg/L, glicina 2 mg/L, tiamina-HCl 1 mg/L, piridoxina-HCl 0.5 mg/L, prolina 500 mg/L, casaminoácidos 300 mg/L, 2,4-D 2 mg/L, sacarosa 30 g/L y agar 8 g/L, pH 5.8 (basado en Stacey G.: <http://www.staceylab.missouri.edu/biolistic-transformation-of-rice>). Los callos se precultivaron durante 4 días a las mismas condiciones de temperatura, HR y luz previas.

- Transformación de callos: se utilizaron dos métodos de transformación: a) usando *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, de acuerdo al protocolo seguido por Ortíz-Berrocal et al., (2017) o b) por biobalística (protocolo de Stacey G. (<http://staceylab.missouri.edu/biolistic-transformation-of-rice/>)). Las plantas transformadas con los vectores RMh, RMheG y RheHP se obtuvieron vía *Agrobacterium*, mientras que las plantas conteniendo los vectores de mayor tamaño se obtuvieron vía biobalística. Para la biobalística se utilizaron 8 µg de ADN por vector de transformación y, 20 pulgadas de Hg de presión de vacío y 1100 psi de presión de Helio para el bombardeo de micropartículas. Antes del bombardeo de partículas, los callos se transfirieron a medio ND2MS (ND2 + manitol 30 g/L + sorbitol 30 g/L) y, posterior al bombardeo, se incubaron en oscuridad durante 16-20 h.
- Selección de callos transformados: Los callos bombardeados se transfirieron a medio N6D + higromicina 75 µg/mL e incubaron a 30 °C, luz continua y HR de 55% durante dos periodos de selección de tres semanas.
- Regeneración de plantas putativamente transformadas: Las plantas putativamente transformadas se regeneraron a partir de callo resistente a higromicina (75 µg/mL) en medio REIII modificado (sales MS (M5524) 4.3 g/L, vitaminas MS (M3900) 1X, casaaminoácidos 2 g/L, ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/L, kinetina 2 mg/L, sacarosa 30 g/L, sorbitol 30 g/L, agar 0.8%, pH 5.8 (Toki et al., 2006) (Figura 5). Se regeneraron plantas durante 6 rondas de cultivo, resembrando en el medio REIII cada dos semanas.
- Enraizamiento de las plantas putativamente transformadas: Las plantas regeneradas se separaron individualmente y transfirieron a cajas magenta que contenían medio HF: sales MS (M5524), 4.3 g/L, vitaminas MS (M3900) 1X, sacarosa 30 g/L, agar 0.8%, pH 5.8. Después de tres semanas a 28 °C y un

fotoperíodo de 12:12 h luz: oscuridad, se inició la etapa de adaptación de las plantas a las condiciones de invernadero.

- Adaptación de plantas transformadas a condiciones de invernadero: Cuando las plantas obtuvieron raíces y habían tocado la parte superior de la caja magenta, se transfirieron a cajas de plástico de 40 x 60 cm que contenían medio Yoshida líquido (Yoshida 1976) y se cubrieron con una bolsa de plástico transparente. Después de tres días, a la cubierta de plástico se le realizaron agujeros pequeños, incrementando el número de agujeros por día para iniciar su adaptación a las condiciones ambientales. Al séptimo día, la bolsa protectora se eliminó y se procedió con el análisis por PCR de las plantas putativamente transformadas. Las plantas permanecieron en medio Yoshida durante dos semanas. Las plantas que resultaron positivas para la presencia de al menos un transgen, se transfirieron a macetas en condiciones de invernadero, usando una mezcla de suelo: vermiculita (1:1) como sustrato previamente esterilizado en autoclave.

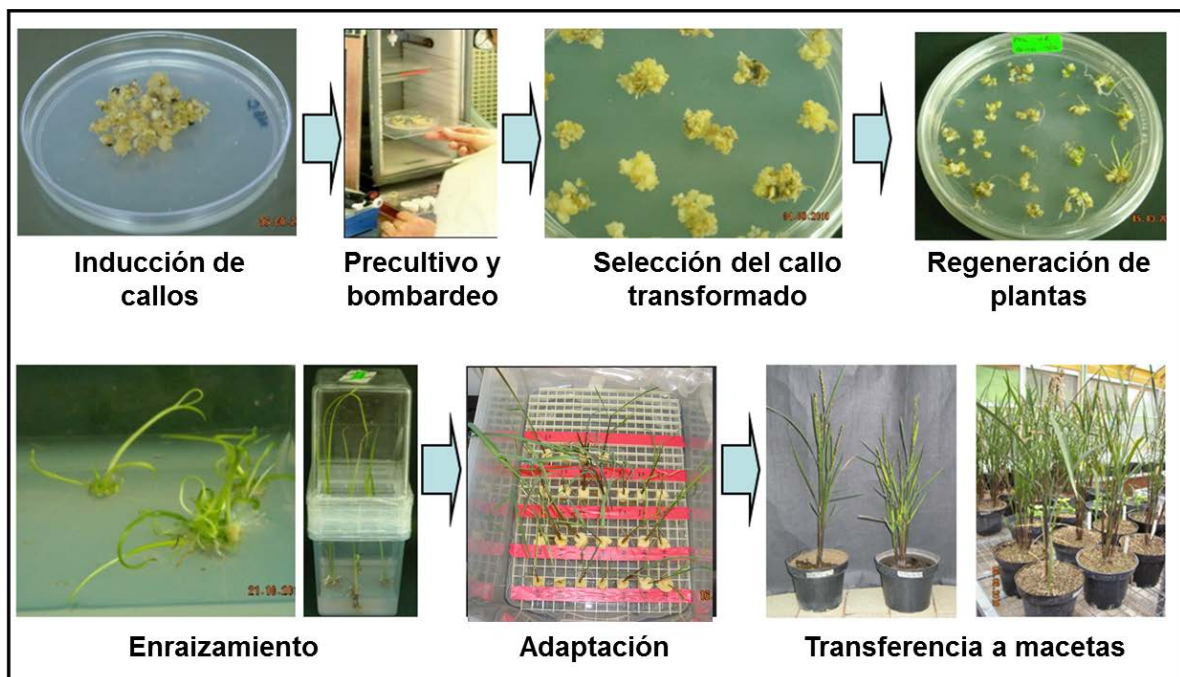


Fig. 5. Proceso de obtención de plantas transformadas de arroz por biobalística. Fotografías propias.

4.2.2 Confirmación de la expresión de los transgenes en las plantas transformadas de arroz.

La presencia de los transgenes en las plantas putativamente transformadas se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos específicos que amplificaron un fragmento del gen de interés (Cuadro 4). La expresión de los transgenes fue confirmada por RT-PCR semicuantitativa utilizando 3 µg de cADN de las plantas transformadas y los oligonucleótidos específicos para amplificar los transgenes.

Cuadro 4. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los transgenes de las plantas putativamente transformadas.

Gen	Secuencias de los oligonucleótidos	Tamaño del amplión
<i>MtNFP</i>	MtNFP 5'-F: 5'-GCCTTCTTTCTTCCTTCTAG-3'	0.864 kb
	MtNFP 3'-R: 5'-GTAAGTTATCTGCAGTCTCG-3'	
<i>MtLYK3</i>	MtLYK3 5'-F: 5'-GTGTGATGTAGCTTTAGCTTC-3'	0.853 kb
	MtLYK3 3'-R: 5'-GATACGTAAACTCTGTGACTTTG-3'	
<i>MtSYMREM1</i>	MtRem-F: 5' AGATCTGCTGTAACCCCTAGAGATACATTATGG-3'	0.7 kb
	MtREM-R: 5'-CCCGGGCTAACTGAAAAACCTTAAACCGCTGA-3'	
<i>LjLNP</i>	(LjLNP-F: 5'-CTCGAGGCATTGGACTAAAGCCATGG-3'	1.3 kb
	LjLNP-R: 5'-CCCGGGCAGGCTTAAGCAGGTACTAGTA-3'	
<i>MtDMI2</i>	DMI2-5'-F: 5'-CAACTAAAGGGTTGAGAGC-3'	0.7 kb
	DMI2-3'-R: 5'-GAAAGTGGAGAAACACAGAG-3'	
ENOD11-Gus	E11407-H-F: 5'-GCGCGAAGCTTAGACACTTAAATTTGAGGGTC-3'	0.6 kb
	5'GUS: 5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3'	
<i>Cameleon 3.6</i>	Camel-5'-F: 5'-TGAAGTTCATCTGCACCAC-3'	0.7 kb
	Camel-3'-R: 5'-TTCCATTGCCATCAGCATC-3'	
<i>HyPer</i>	HyPer 5'-F: 5'- CCGCTGCACATTGGTTTGATTTC-3'	0.7 kb
	HyPer 3'-R: TGAAGTTGTGGCCGTTTACG	

4.2.3 Determinación del número de copias de los transgenes y las líneas transgénicas provenientes de eventos de transformación independientes.

El número de copias de los transgenes en las plantas transformadas, así como el número de líneas transgénicas provenientes de eventos de transformación independientes se determinaron por Southern blot. El ADN genómico se aisló de acuerdo con Dellaporta et al. (1983) y se digirió con *Hind III* para las plantas transformadas con los vectores control y con *BamHI* para las plantas que se transformaron con los receptores de factores Nod. La preparación de la sonda, hibridación, lavados, bloqueo y detección quimioluminiscente se hicieron de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Roche Applied Science). Se detectaron los genes *Hpt* para las plantas transformadas con los vectores control y *NFP* para las que se transformaron con los receptores de factores Nod.

4.3 Evaluación de la respuesta de las raíces transformadas de arroz a las señales rizobiales: Inoculación con rizobacterias y tratamientos con factores Nod.

4.3.1 Evaluación del fenotipo de las plantas transformadas F0 y F1.

Una vez confirmada la presencia y expresión de los transgenes en las plantas de arroz, se procedió con la comparación fenotípica de las hojas, tallos, raíces, flores, panículas y semillas entre las plantas transformadas (F0 y F1) con los genes de interés y las plantas transformadas con el vector vacío y las silvestres.

4.3.2 Evaluación de la funcionalidad del promotor de la nodulina ENOD11 fusionado a Gus en leguminosas y plantas transformadas de arroz

La funcionalidad de la construcción E11P-Gus-NosT se evaluó en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa) transformadas vía *Agrobacterium*

rhizogenes K599 (portando el vector RheHP) siguiendo la metodología de Estrada-Navarrete et al. (2007). La expresión de Gus fue evaluada en las raíces transformadas de las plantas de frijol 21 días después de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899.

La actividad de Gus se evaluó también en raíces de plantas de arroz en distintas condiciones:

a) Plantas control R86, RMh, RMhEG y RMHE11GHP se incubaron en medio Yoshida con o sin nitrógeno durante 3 días y posteriormente, se trataron con o sin factores Nod durante 24 h. Se evaluaron cinco réplicas.

b) Plantas RMhEG y J5hLeGCM crecidas en solución Yoshida durante 8 días, se transfirieron a Yoshida–N, y trataron durante 24 h con factores Nod, citidina, citidina + factores Nod, zebularina, zebularina + factores Nod, citidina + ANA, citidina + kinetina, zebularina + ANA y zebularina + kinetina. A las 24h se renovó el medio con los mismos tratamientos y se incubaron nuevamente por 24 h. Las concentraciones usadas en los tratamientos fueron citidina 10 μ M, zebularina 10 μ M, ANA 5 μ M, kinetina 10 μ M, factores Nod 1×10^{-9} M. Después de las 48 h de tratamiento, se evaluó la actividad de Gus en las raíces de las plantas de arroz. Se observaron cinco réplicas por constructo.

Para la evaluación de la expresión de Gus, las raíces se incubaron durante 12-24 h a 37 °C en una solución que contenía K_2HPO_4 100 mM, KH_2PO_4 100 mM, EDTA 10 mM, Triton-X 0.1% $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 mM, $K_2Fe(CN)_6$ 0.5 M y X-gluc (sal de ciclohexil amonio 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido disuelta en dimetilformamida) 1 mM.

*4.3.3 Respuesta de las raíces transformadas de arroz a la inoculación con las cepas *S. meliloti* 1021 y *S. fredii* NGR234.*

Para la inoculación rizobial se utilizó la cepa de *S. meliloti* 1021 porque esta cepa es reconocida apropiadamente por los receptores MtLYK3 y MtNFP de *M. truncatula* que están presentes en las plantas transformadas de arroz. También se utilizó la cepa de *S. fredii* NGR234 por su capacidad de interactuar simbióticamente con un amplio rango de plantas leguminosas. Con la finalidad de que ambas cepas fueran capaces de producir factores Nod independientemente de la presencia de flavonoides y para poder visualizarlas en la raíz por microscopía de fluorescencia, ambas cepas se transformaron con el plásmido pDG77-FITA-DO (FITA: flavonoid independent transcription activator) acarreando el gen reportero DsRed que codifica la proteína roja fluorescente. Adicionalmente, la cepa de *S. meliloti* 1021-DG77-FITA-DO se transformó con el plásmido pHER conteniendo el gen de la β -glucosidasa.

Plantas transformadas de arroz (T2) de 8 días post-germinación en condiciones estériles, se transfirieron a tubos de vidrio de 22 x 150 mm que contenían agar medio Yoshida estéril sin nitrógeno y se inocularon con 1 mL de la suspensión rizobial. Ocho días después de la inoculación rizobial, se observó la morfología de los pelos radicales y la colonización rizobial en cinco réplicas por condición.

*4.3.4 Respuesta de las raíces de arroz al tratamiento con factores Nod provenientes de las cepas *S. meliloti* 1021 y *S. fredii* NGR234.*

Los factores Nod se aislaron de acuerdo con Cárdenas et al. (1995). Las cepas *S. meliloti* 1021 y *S. fredii* NGR234 se cultivaron durante 72 y 24 h, respectivamente a

30 °C y a 100 rpm en medio B- [manitol 10 g/L, MgSO₄ 0.55 g/L, KNO₃ 0.55 g/L, Ca(NO₃)₂·4H₂O 1.3 g/L, Fe(III)Na EDTA 33 mg/L, biotina 0.2 mg/L, tiamina-HCl 5 mg/L, elementos traza Gibson 1X (Stock 1000X: H₃BO₃ 2.86 g/L, MnSO₄·4H₂O 2.03 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.08 g/L, H₂MoO₄·H₂O 0.08 g/L), K₂HPO₄ 1mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7.2]. Luego se agregó 1-butanol 500 mL y se continuó incubando durante 24 h a 30 °C en agitación. Enseguida, se separó la fase butanólica y se evaporó hasta sequedad en un rotaevaporador a 50 °C. El polvo blanco-amarillento resultante se resuspendió en 20 mL de acetonitrilo al 60% y se mantuvo en agitación durante 5 h, luego se agregaron por dos veces consecutivas 20 mL de H₂O estéril y se dejó agitando por 24 h hasta disolver completamente el polvo. Esta disolución se pasó por una columna de octadecyl C18 previamente equilibrada con acetonitrilo al 20%. Los factores Nod se recuperaron con 2 mL de acetonitrilo al 60% y diluyeron al 20% con H₂O estéril antes de ser separados en un cromatógrafo de líquidos (HPLC). Los factores Nod purificados se recuperaron, el acetonitrilo se evaporó en un rotaevaporador, se liofilizaron para eliminar el agua y resuspendieron en CHAPS 0.1% a una concentración de 1×10^{-7} M.

La actividad biológica de los factores Nod aislados se probó previamente en raíces de *Medicago sativa* L. var. Moapa 69; los factores Nod se aplicaron a una concentración de 1×10^{-9} M durante 5 h en medio Summerfield (0.5x) sin nitrógeno. Para el tratamiento con factores Nod en plantas transformadas de arroz (T2), se usaron plantas de 8 días de edad, germinadas en condiciones estériles, y mantenidas en medio Yoshida. Las plantas luego se transfirieron a medio Yoshida deficiente de nitrógeno durante 24 h, luego el medio se renovó y mantuvo por 24 h más y entonces se aplicó el tratamiento con los factores Nod a 1×10^{-9} M. Plantas tratadas con CHAPS 0.001% (disolvente de los factores Nod) se usaron como control. Después de 24 h de tratamiento se observó la morfología de los pelos radicales de las plantas de arroz (se analizaron cinco réplicas por condición).

Los porcentajes de deformación de pelos radicales en plantas control RMh y PhL con las inoculaciones rizobiales y con los tratamientos con factores Nod se analizaron separadamente por un análisis de varianza de dos vías, usando una suma de cuadrados tipo III (R ver. 3.1 2014). Los porcentajes de deformación de pelos radicales se transformaron (angular) para homogenizar las varianzas. El análisis estadístico se realizó usando un modelo de simplificación basado en la aproximación de Crawley (1993) y una prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas.

4.3.5 Análisis transcriptómico de las plantas transformadas de arroz en respuesta al tratamiento con factores Nod.

Plantas de arroz RMh y PhL crecidas en tubos con medio Yoshida completo estéril durante 2 meses se transfirieron a medio Yoshida sin nitrógeno por 24 h y se trataron con factores Nod (10^{-9} M) de *S. meliloti* 1021- pDG77-FITA-DO o CHAPS (0.001%). Después de 24 h, las raíces se colectaron y almacenaron a -80 °C hasta la obtención del ARN. Las muestras de ARN se enviaron a los laboratorios de BGI (Beijing Genome Institute) Américas para el análisis del transcriptoma vía Illumina HiSeq 2000. Tres réplicas de las siguientes condiciones se enviaron a analizar: A) RMh, B) RMh + NF, C) PhL, y D) PhL + NF.

El análisis de la expresión diferencial de los genes en las distintas condiciones se realizó con el programa NOISeq-sim versión 2.6.0 de acuerdo con Tarazona et al. (2015). Los genes diferencialmente expresados (DEGs; $|\log_2\text{ratio}| \geq 1.5$) en las muestras se compararon en las combinaciones C vs A, B vs A y D vs C. El análisis de la ontología de genes se basó en TopGO v.3.0.2. (Alexa y Rahnenfürer, 2016) y los DEGs en las vías de señalización involucradas se analizó con la base de datos KEGG Pathway de acuerdo con Tanabe y Kanehisa (2012).

4.3.6 Validación de los datos transcriptómicos por amplificación en tiempo real (RT-qPCR).

La validación de la expresión diferencial de genes representativos se realizó por RT-qPCR de las raíces de las plantas RMh y PhL tratadas o no con los factores de nodulación: A) RMh, B) RMh + NF, C) PhL, y D) PhL + NF, de acuerdo con Hernández et al. (2007) y Ramírez et al. (2013). Todos los genes seleccionados mostraron una expresión diferencial (log2 ratio) vía RNAseq mayor a 1.5 en al menos un par de comparaciones. Las secuencias de los oligonucleótidos usadas en el RT-qPCR se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la validación de genes por RT-qPCR.

Nombre	Sentido directo (Forward)	Sentido inverso (Reverse)
Nicotianamine synthase (LOC_Os03g19420.1)	CTGAGTGCCTGCATAGTAATCC	ACCTCTTGCTTTCTCAGCACC
Expressed protein 1 (LOC_Os02g33070.1)	TCGCCCAACCTGATCCGCTG	TTCTTGACTCCTTTCCCACTGTACAG
Glutathione S-transferase GSTU6 (LOC_Os10g38340.1)	CCAGTTGAAGTTTGCTGAATCC	TAGAATAGCCACTTCCCAC
Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein (LOC_Os04g27060.1)	ACGTTGTGCAAGGTGACAG	CACATGGCAAAAACACTGGAACA
Major facilitator superfamily antiporter (LOC_Os11g04020.1)	TTGCGTTGACCTTCAAGCCG	GTCTATGCTTGCATCCACGC
Expressed protein 2 (LOC_Os08g05960.1)	TGCTAGTGTGCTAGGGAGG	CAACAGGATAACGAGTACAGAGC
Transketolase (LOC_Os07g09190.1)	GCACTTCAGCTCAGCTGAA	CAAGAAACACATACACATGGGC
B12D protein (LOC_Os07g41350.1)	GTGACCGTCAAACTGATCC	TAAGTTGCGACGTATGCGAC

Se analizaron tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas. La expresión relativa se calculó usando el método comparativo Ct (Livak y Schmittgen, 2001) usando los genes de referencia de la proteína cinasa 1 (LOC_Os06g48970.1), la proteína expresada (LOC_Os07g02340.1) y la proteína de enlace a ácidos nucleicos (LOC_Os06g11170.1) (Narsai et al., 2010). Los resultados se analizaron con una prueba de t Student con un valor de P = 0.05.

4.3.7 Evaluación de la actividad nitrogenasa en raíces inoculadas con bacterias rizobiales.

La actividad nitrogenasa se evaluó mediante el método de la reducción de acetileno (Hardy et al., 1968). Plantas de arroz RMh y PhL crecidas en 80 mL de medio Yoshida estéril durante dos meses se transfirieron a medio Yoshida-N estéril (80 mL) y se les agregó 1.5 mL del cultivo de *S. meliloti*-DG77-FITA-pHER (D.O 600 nm= 0.66, $\sim 5 \times 10^8$ bacterias/mL). Enseguida las plantas se mantuvieron a un fotoperíodo de 16:8 h L:O y 25 °C durante 15 días, agregándoles Yoshida-N cada cinco días. Luego las raíces se cortaron e incubaron en frascos herméticos con acetileno y la reducción del acetileno se evaluó en un cromatógrafo de gases a los 2, 7 y 14 días de incubación. Las plantas sin inoculación bacteriana se usaron como control. Se analizaron cinco réplicas.

5. Resultados

5.1 Construcción de los vectores de transformación conteniendo genes marcadores y los genes de leguminosas.

Se construyeron diez distintos vectores de transformación que consistieron en cuatro vectores control RMh, RMheG, RheCM y RheHP, dos vectores conteniendo los genes involucrados en la percepción de los factores Nod (PhL y J5hL) y cuatro más conteniendo los genes relacionados con la percepción de los factores Nod y los sensores de calcio o especies reactivas de oxígeno (PhLeGHP, PhLeGCM, J5hLeGHP y J5hLeGCM; Cuadro 2). Los vectores control consistieron en: RMh, que contenía el vector vacío pRCS2 + el gen de resistencia a la higromicina *Hpt* (usado como gen marcador de resistencia en los tejidos transformados); RMheG, consistió en el vector RMh más el promotor de la nodulina temprana *ENOD 11* fusionado a *Gus*. Los vectores RheHP y RheCM, contenían RMh más el gen *Hyper* o *Camaleon*, sensores de especies reactivas de oxígeno o de calcio, respectivamente. El resto de los vectores conteniendo los genes de leguminosas y combinaciones diferentes de los sensores se muestran en el Cuadro 6.

5.2 Obtención de plantas de arroz transformadas, expresión de los transgenes y determinación del número de copias.

Las plantas de arroz transformadas con los cuatro primeros vectores se obtuvieron mediante la transformación por *A. tumefaciens* y las plantas transformadas con los vectores restantes se obtuvieron vía biobalística. Se logró la obtención de plantas transformadas con casi todos los vectores, excepto por RheCM y la combinación J5hL+RheHP (Cuadro 6). El análisis por PCR de las plantas putativamente transformadas mostró que de un total de 394 plantas analizadas, 207 resultaron positivas para la presencia del gen *Hpt*, lo que representa aproximadamente un 52% de eficiencia de transformación. El número de plantas

regeneradas por vector fue variable obteniendo el mayor número con PhLeGHP y PhLeGCM.

Cuadro 6. Plantas transformadas con los genes señalizadores de la percepción de factores Nod y sensores de ROS y Ca²⁺.

VECTOR RCS2	GENES PRESENTES EN LOS RESPECTIVOS PLÁSMIDOS	# de callos infectados	# de plantas transformadas/total analizadas	# de copias del gen	# de plantas con semillas
RMh	<i>Hpt</i>	Mediante <i>A. tumefaciens</i>	6/73 ^a	2	6
RMheG	<i>Hpt, E11P-GUS</i>		^a	--	--
RheHP	<i>Hpt, E11P-GUS, HP</i>		10/13	1	9
RheCM	<i>Hpt, E11P-GUS, CM3.6</i>		^d	--	--
PhL	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP</i>	38	7/11	2 y 4	0
J5hL	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP, DMI2</i>	40	29/41	1-4	3
PhLeGHP	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP, E11P-GUS, HP</i>	55	23/98	1	3
PhLeGCM	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP, E11P-GUS, CM3.6</i>	55	7/21	4 y 5	1
J5hLeGHP	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP, DMI2, E11P-GUS, HP</i>	73	12/36	1 y 3	10
J5hLeGCM	<i>Hpt, LjLNP, LYK3, SYMREM, NFP, DMI2, E11P-GUS, CM3.6</i>	58	3/5	2 y 4	0
Combinaciones	PhL + RheHP	30	63/116	6	3 (2 ^b)
	PhL + RheCM	30	57/59	1-6	22
	J5hL + RheHP	36	0	--	--
	J5hL + RheCM	36	6/7	4	6 (4 ^c)

^a Plantas obtenidas por Ortíz-Berrocal et al. (2017).

^b Las plantas transformadas presentaron los genes correspondientes al vector PhL (*Hpt, LjLNP, LYK3, MtSYMREM, NFP*).

^c Las plantas transformadas presentaron los genes de ambos vectores J5hL (*Hpt, LjLNP, LYK3, MtSYMREM, NFP, DMI2*) y RheCM (*Hpt, E11P-GUS, CM3.6*).

^d Plantas obtenidas posteriormente por Lourdes Velázquez.

^{b y c} Plantas productoras de F1 transformadas

El análisis por PCR para confirmar la presencia de todos los transgenes en las plantas putativamente transformadas mostró que no todas las plantas

transformadas presentaron todos los genes presentes en los vectores de transformación correspondiente.

La expresión de los transgenes en las plantas transformadas F0 se confirmó por RT-PCR semicuantitativa usando cADN de hojas. La expresión de los transgenes fue variable entre las plantas transformadas con los diferentes vectores e incluso entre las transformadas con el mismo vector (Figura 6). No se observó expresión de los transgenes en las plantas silvestres (WT R86).

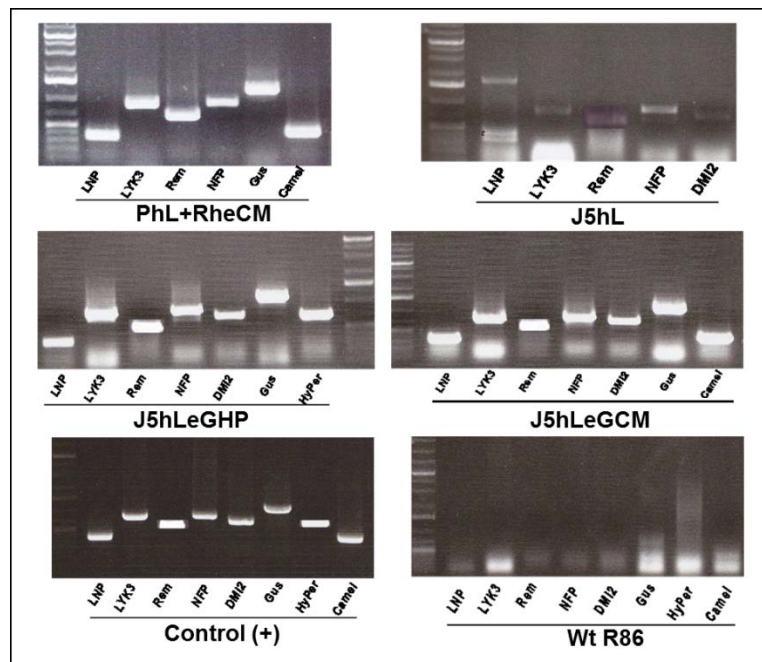


Fig. 6. Expresión de los transgenes en plantas transformadas de arroz. Ejemplos de la expresión de los transgenes por RT-PCR usando 3 μ g de cDNA de hojas de plantas transformadas con los vectores de transformación PhL+RheCM (#2), J5hL (#14), J5hLeGHP (#5) J5hLeGCM (#1) y en la planta de arroz silvestre (WT R86). La amplificación de los transgenes en el vector J5hLeGCM se usó como control positivo.

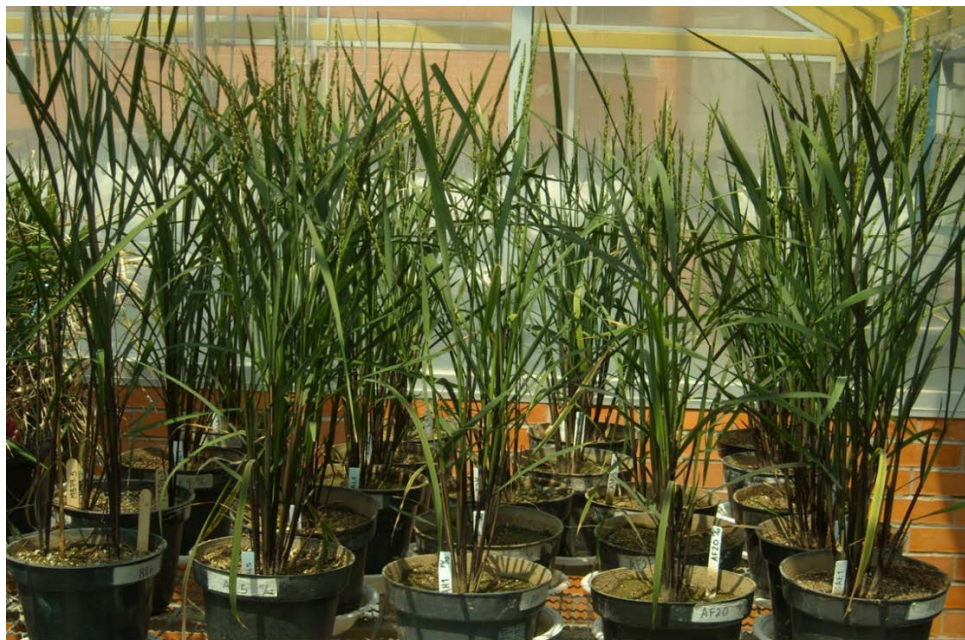
El número de copias de los transgenes en las plantas transformadas y el número de líneas transgénicas provenientes de eventos de transformación independientes se determinaron por Southern blot. Se detectó el gen *Hpt* en las plantas que contenían los vectores control (RMh, RMheG, RheHP y RheCM) y *NFP*

para las plantas conteniendo los receptores de factores Nod (PhL, J5hL, PhLeGHP y PhLeGCM). De una a seis copias de los genes se encontraron presentes en la plantas transgénicas y hasta seis de líneas independientes de plantas transformadas (Cuadro 6).

5.3 Fenotipo de las plantas transformadas de arroz y su respuesta a las señales rizobiales

5.3.1 Fenotipo de las plantas transformadas de arroz

La mayoría de las plantas transformadas presentaron el fenotipo típico de una planta de arroz R86 silvestre. Las plantas crecieron produciendo vástagos con tallos redondos, huecos, de color púrpura con nodos e internodos; el tamaño de las plantas fue de alrededor de 1 m de altura (Figura 7).



R86 PhL + RheCM PhLeGCM J5hL PhL

Fig. 7. Comparación fenotípica entre plantas de arroz silvestres R86 (control) y plantas transformadas con los vectores de transformación PhL+RheCM, PhLeGCM, J5hL y PhL, en condiciones de invernadero.

Las plantas presentaron hojas planas, alargadas y de color verde intenso; produjeron inflorescencias con aproximadamente 200 flores por panícula. Las flores presentaron un aparato reproductor femenino (compuesto por el ovario, el estilo y el estigma bifurcado y 6 estambres) protegido por una cubierta dura constituida por la pálea y la lema (Figura 8).

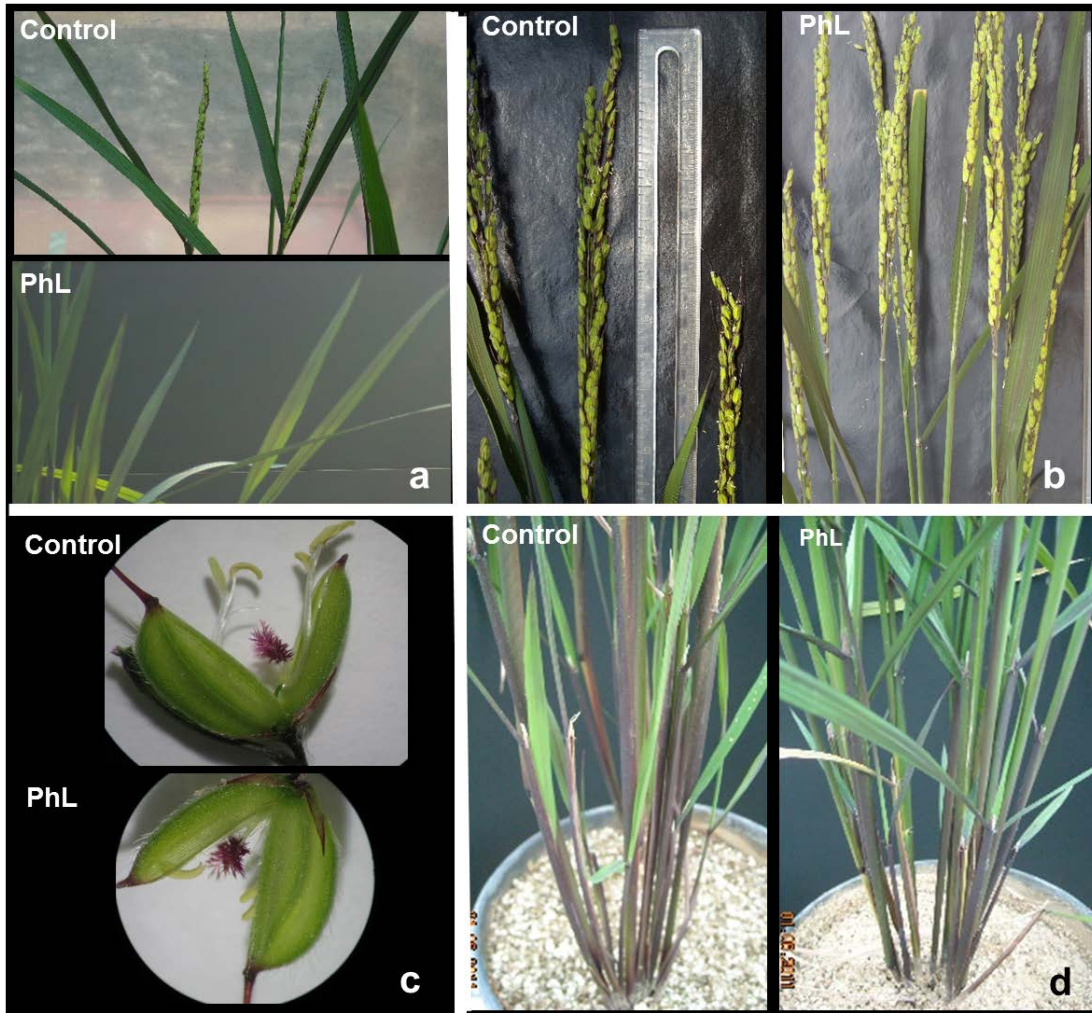


Fig. 8. Fenotipo de hojas (a), panículas (b), flores (c) y base de los tallos de las plantas silvestres y transgénicas conteniendo el vector PhL.

El sistema radical de las plantas F1 jóvenes consistió de radícula, raíces seminales, nodales y laterales y, en general fue muy similar entre las diferentes

plantas transformadas y la silvestre. Algunos tipos (1, 2, 3) de plantas transformadas con el vector J5hleGCM presentaron una raíz ligeramente menos abundante y de menor tamaño que la silvestre (Figura 9).



Fig. 9. Fenotipo de raíces de plantas de arroz transformadas con los vectores RMh, RMheG, RheHP, PhL y J5hLeGCM (F1) comparado con la raíz de la planta silvestre WT R86. Plantas de 22 días post-germinación creciendo en medio Yoshida.

Aunque el fenotipo de las plantas jóvenes fue muy similar entre las transformadas y la silvestre, las plantas maduras PhL y, principalmente J5hLeGCM (F1) presentaron más nodos y raíces adventicias que la silvestre (Figura 10).

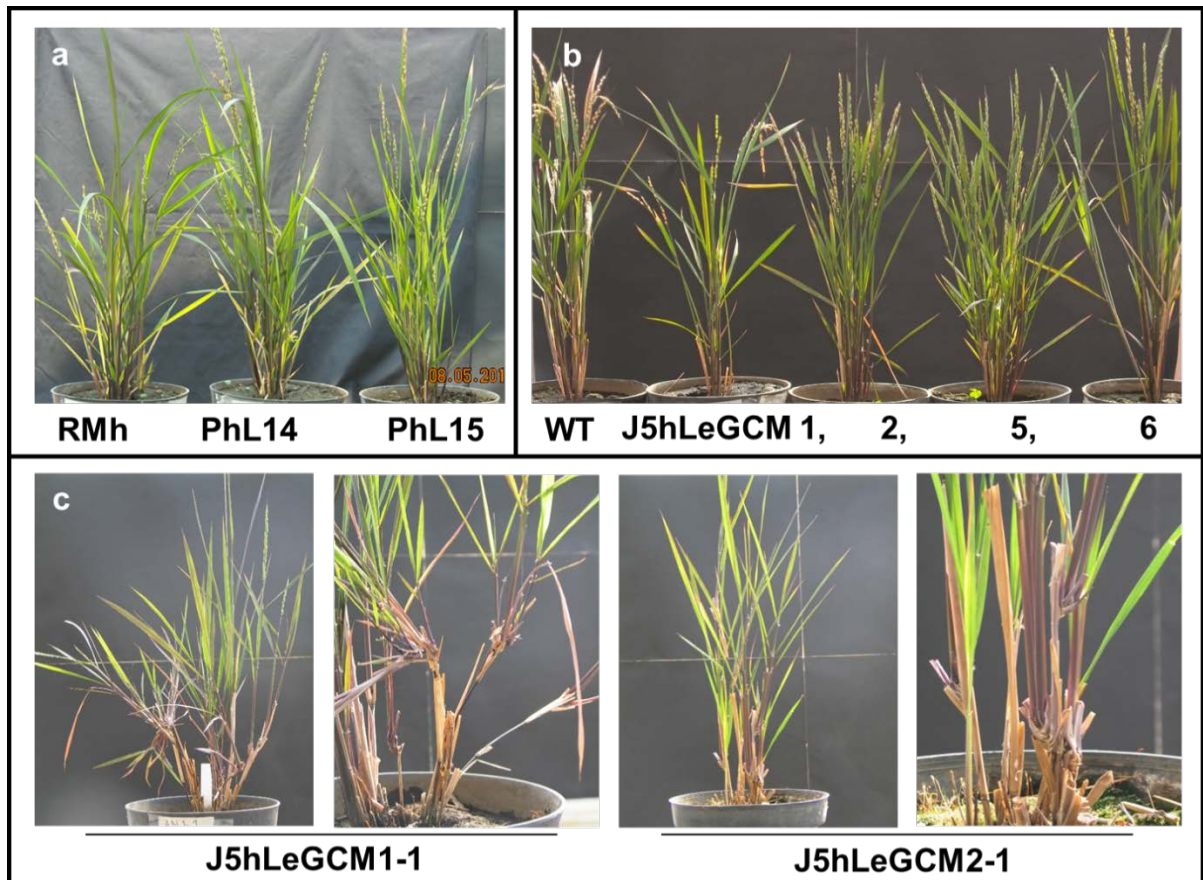


Fig. 10. Fenotipo de los tallos de plantas de arroz silvestres (WT) y transformadas con los vectores (a) RMh, PhLeGHP y PhL, (b) J5hLeGCM 1, 2, 5 y 6 y (c) J5hLeGCM1-1 y J5hLeGCMn2-1, éstas últimas muestran los nodos adventicios.

La producción de semillas también se redujo en las plantas transformadas. De las 207 plantas T0 que resultaron positivas para la presencia de los vectores que contenían los genes receptores de factores Nod (PhL y J5hL en distintas combinaciones), solamente 48 produjeron semillas (J5hL 3, PhLeGHP 3, PhLeGCM 1, J5hLeGHP 10, PhL+RheHP 3, PhL+RheCM 22, J5hL+RheCM 6; Cuadro 6). Sin embargo, más del 90% de las plantas T1 analizadas (426 plantas en total) resultaron negativas para la presencia de los transgenes. Las plantas transformadas T0 que expresaron adecuadamente los transgenes no produjeron semillas, produjeron semillas no transformadas o produjeron una cantidad muy reducida de semillas que sí resultaron positivas para la presencia de los transgenes en la T1. De la

combinación PhL+RheHP, dos plantas T0 que resultaron positivas para la presencia de PhL y cuatro plantas con la combinación J5hL+RheCM, es decir, seis plantas en total produjeron una cantidad limitada de semillas (aproximadamente 20 semillas) que conservó los transgenes en la T1 (Cuadro 6). En contraste, las plantas silvestres WT y las transformadas con los vectores control produjeron más de 500 semillas. En plantas PhL y J5hLeGCM T2 la producción de semillas mejoró hasta casi un 40 y 60% de llenado de la panícula, respectivamente, comparado con el 80-90% de las plantas control (Figura 11).

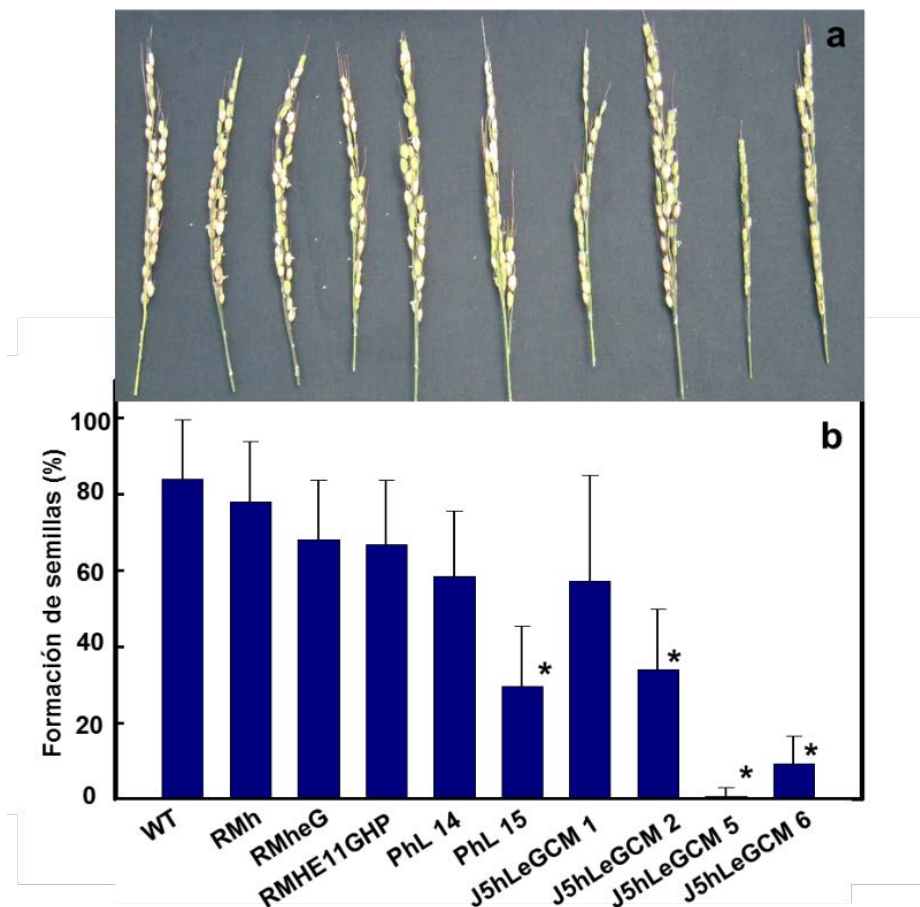


Fig. 11. Panículas con semillas (a) y porcentaje de formación de semillas (b) en plantas de arroz T2. El porcentaje de formación de semillas se obtuvo del conteo de semillas formadas en diez panículas por planta. *El porcentaje semillas en plantas PhL 15, J5hLegCM 2, 5 y 6 fue significativamente más bajo que en las plantas silvestres WT y RMh ($p < 0.001$).

Las plantas transformadas con los vectores RMh (vector RCS2 + *Hpt*), RMheG (vector RCS2 + *Hpt* + *E11-Gus*), PhL (vector RCS2 + *Hpt* + *LjLNP* + *LYK3* + *MtSYMREM* + *NFP*) y J5hLeGCM (vector RCS2 + *Hpt* + *LjLNP* + *LYK3* + *MtSYMREM* + *NFP* + *DMI2* + *E11-Gus* + *Cameleon*) que produjeron plantas T1 y T2 transformadas se utilizaron para realizar las comparaciones fenotípicas y el análisis de la respuesta a las señales rizobiales.

5.3.2 Evaluación de la actividad de *E11P-Gus* en plantas de frijol y arroz

La funcionalidad de la construcción *E11-Gus* se validó primero en un sistema de raíces “peludas” de frijol (*P. vulgaris* cv. Negro jamapa) obtenidas mediante la transformación con *A. rhizogenes* portando el vector RheHP. Después de 21 días de la inoculación con *R. tropici*, la actividad de *Gus* se observó en los primordios nodulares, haces vasculares, en el sitio de emergencia de raíces laterales, y en nódulos (Figura 12).

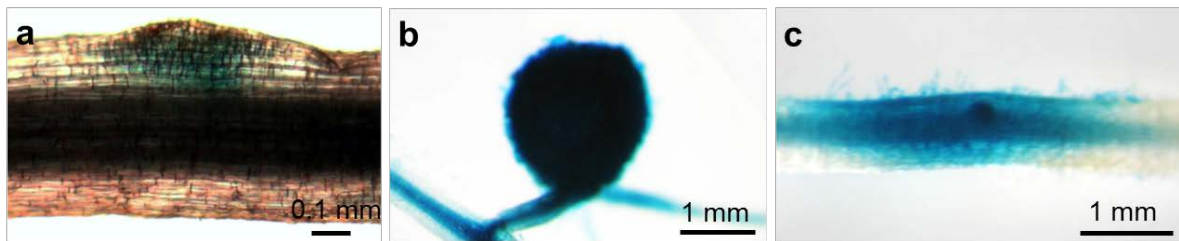


Fig. 12. Actividad de *Gus* en primordios nodulares (a), haces vasculares y nódulo (b), sitio de emergencia de raíces laterales (c), de raíces de frijol cv. Negro Jamapa transformadas con el vector RheHP e inoculadas con *R. tropici* (21 días después de la inoculación).

La actividad de *Gus* fue analizada en a) plantas silvestres WT, RMh, RMheG y RMHE11GHP crecidas en medio Yoshida con o sin nitrógeno durante 3 días y tratadas posteriormente con o sin factores Nod durante 24 h, y b) plantas RMheG y J5hLeGCM crecidas en solución Yoshida durante 8 días, transferidas a Yoshida–N, y tratadas durante 48 h con factores Nod y no se observó la actividad de *Gus*.

Para evaluar si la expresión de los transgenes estaba siendo inhibida por metilación del ADN, la actividad de Gus también se evaluó en raíces de plantas tratadas con citidina y zebularina, ambos inhibidores de la metilación del ADN. El tratamiento de las raíces con citidina, citidina + factores Nod, zebularina, zebularina + factores Nod, citidina + ANA, citidina + kinetina, zebularina + ANA y zebularina + kinetina no indujo la actividad de Gus en las raíces de arroz.

5.3.3 Respuesta de las plantas de arroz a inoculaciones con bacterias rizobiales

La colonización de las bacterias rizobiales en las raíces de las plantas PhL y J5hLeGCM se evaluó en ausencia de nitrógeno e inoculando con la cepa generalista *S. fredii* NGR234 y con *S. meliloti* 1021, específica para los receptores de factores Nod de *M. truncatula*. Las bacterias rizobiales se encontraron en la superficie de la raíz, en los sitios de emergencia de las raíces laterales y sobre los pelos radicales, no se encontró evidencia de que las bacterias estuvieran dentro de las células. Sin embargo, una mayor densidad de bacterias se observó sobre las raíces de las plantas control RMh y RMheG comparado con las PhL y J5hLegCM (Figuras 13 y 14).

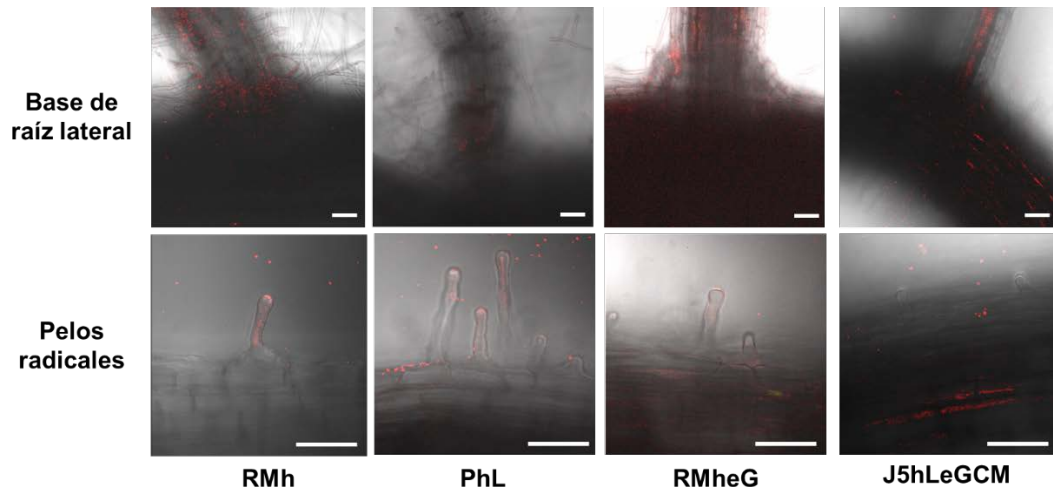


Fig. 13. Colonización rizobial en las bases de las raíces laterales (20x) y pelos radicales (63x) de las plantas RMh, PhL, RMheG, y J5hLeGCM inoculadas con *S. fredii* NGR234 marcadas con DsRED y FITA. Las microfotografías se tomaron 8 días después de la inoculación. Escala de barra 50 µm.

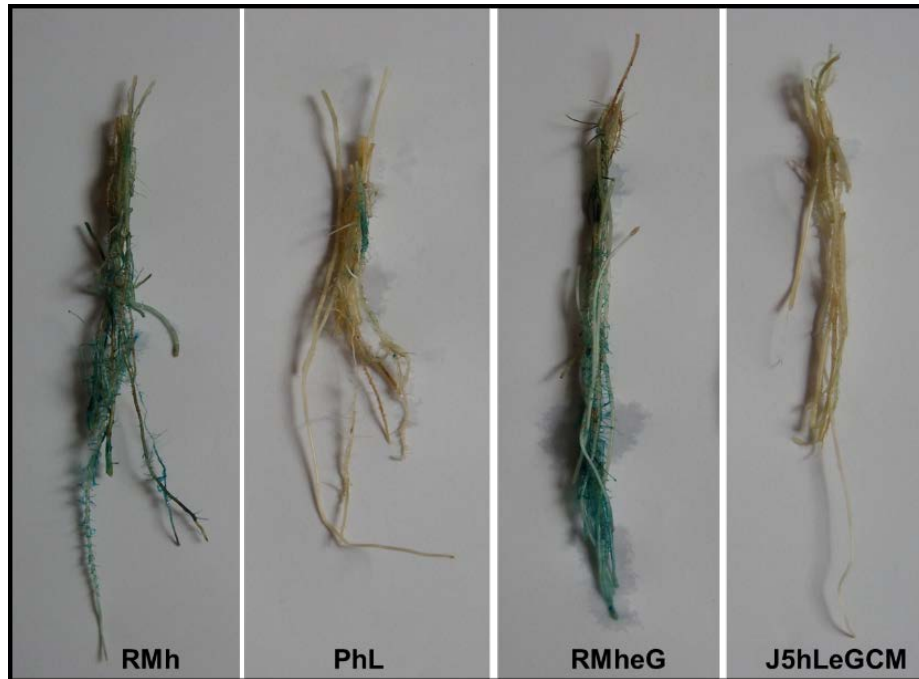


Fig. 14. Colonización rizobial en raíces de arroz de plantas RMh, PhL, RMheG, y J5hLeGCM ocho días después de la inoculación con *S. meliloti* 1021-DG77-FITA-pHER.

Las inoculaciones rizobiales produjeron deformaciones en los pelos radicales de las raíces de arroz (pelos curvados, inflamados en la punta o con protuberancias) (Figura 15). Los pelos radicales en las plantas PhL inoculadas con *S. meliloti* particularmente mostraron deformaciones más notables en la punta de los pelos radicales comparadas con *R. NGR234*. Las plantas de arroz RMh y PhL no inoculadas raramente presentaron deformaciones (Figura 15). Aunque el porcentaje de pelos deformes entre plantas (RMh y PhL) inoculadas y no inoculadas fue significativamente diferente (Tukey HSD; $P=0.0335$ y $P= 0.0375$, respectivamente), los porcentajes de pelos deformes en respuesta a las inoculaciones no fueron significativamente diferentes entre las plantas RMh y PhL, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre las cepas utilizadas (Figura 15).

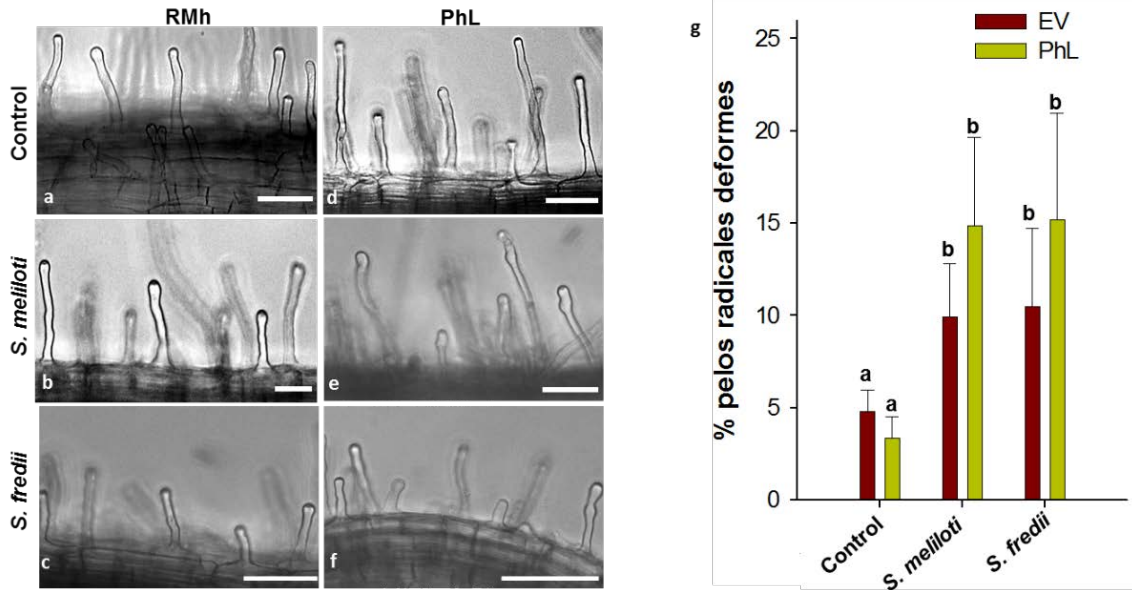


Fig. 15 Respuesta de los pelos radicales en (a-c) plantas control RMh y (d-f) plantas PhL a la inoculación con bacterias rizobiales (ocho días después de la inoculación). Raíces control (no inoculadas) (a, d) o inoculadas (b-f) con cepas rizobiales marcadas con DsRED y FITA, (b, e) *S. meliloti* 1021 o (c, f) *S. fredii* NGR234. Barra = 50 µm. (g). Cuantificación de los pelos radicales deformes en la zona de diferenciación/maduración de la raíz principal de las plantas RMh y PhL inoculadas o no con las cepas rizobiales. El número de pelos radicales deformados se expresa en porcentaje (n=5).

5.3.4 Respuesta de las raíces de leguminosas y de arroz al tratamiento con factores de nodulación

Antes de evaluar si la deformación de los pelos radicales en las plantas de arroz podría incrementarse en respuesta al tratamiento con factores Nod, se confirmó que los factores Nod aislados de *S. meliloti* 1021 y de *S. fredii* NGR234 indujeron la deformación de pelos radicales en raíces de *M. sativa* (Figura 16).

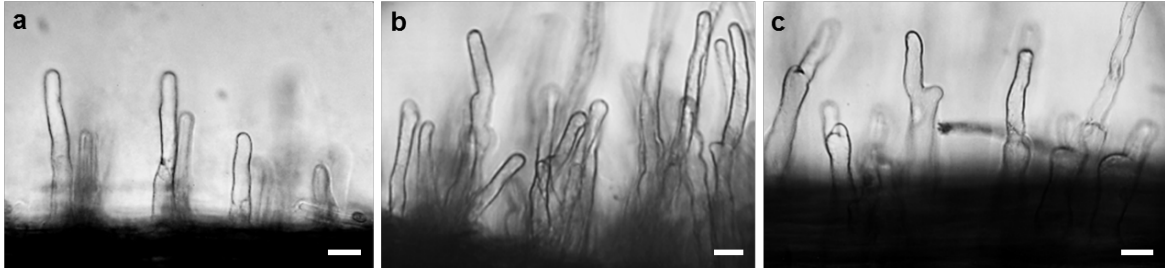


Fig. 16 Deformación de los pelos radicales de *M. sativa* en respuesta a los factores Nod. Pelos radicales tratados con a) CHAPS 0.001%, o con factores Nod (1×10^{-9} M) de b) *S. meliloti* 1021 o c) *S. fredii* NGR234 durante 24 h.

Una vez confirmada la efectividad de los factores Nod, las plantas RMh, RMheG, PhL y J5hLeGCM se trataron con factores Nod (1×10^{-9} M) o CHAPS (0.001%; usado como disolvente). El tratamiento con los factores Nod indujo deformaciones consistentes en los pelos radicales de la zona de diferenciación/maduración de las raíces de las plantas muy similares a los observados con las inoculaciones bacteriales (Figura 17).

El porcentaje de pelos deformes observados en RMh-RMheG vs PhL-J5hLeGCM en condiciones control (expuestas a CHAPS) no fue diferente significativamente ($P=0.796$). Las plantas RMh, PhL, RMheG y J5hL presentaron un porcentaje de pelos deformes significativamente mayor cuando se les expuso a los factores Nod comparado con las que se trataron con CHAPS (RMh-PhL, control vs Sm-Rf, $P<0.0001$; RMheG-J5hLeGCM, control vs Sm-Sf, $P<0.0001$). Con excepción del porcentaje de pelos deformes en PhL vs J5hLeGCM tratados con factores Nod de *S. fredii* ($P<0.01$), el porcentaje de los pelos deformes en las plantas tratadas con los factores Nod fue Independiente del tipo de cepa rizobial (RMh-PhL, Sm vs Sf, $P=0.63$; RMheG-J5hLeGCM, Sm vs Sf, $P=0.29$; PhL-J5hLeGCM, Sm vs Sf, $P=0.73$; PhL, Sm vs J5hLeGCM, Sm, $P=0.95$).

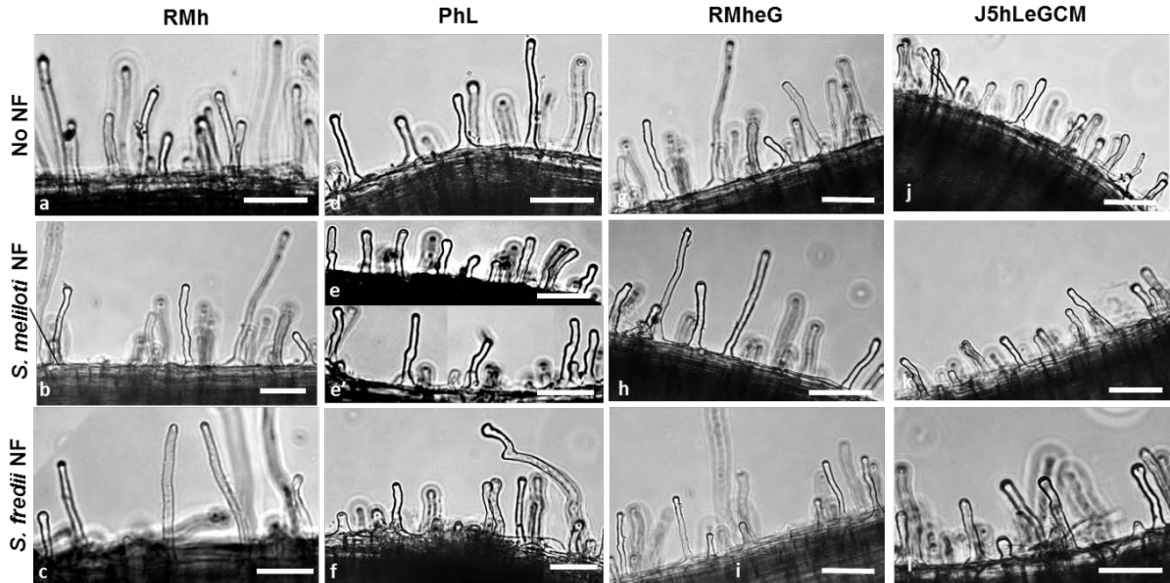


Fig. 17 Deformación de pelos radicales de raíces de arroz en respuesta al tratamiento con factores Nod. Respuesta de los pelos radicales en plantas control RMh (a-c), PhL (d-f), RMheG (g-i) y J5hLeGCM (j-l) al tratamiento con factores Nod durante 24 h. Las raíces se trataron con (a, d, g, i) CHAPS 0.001% (No NFs) o (b-f) con factores Nod ($\sim 10^{-9}$ M) de (b, e) *S. meliloti* 1021 o (c, f) *S. fredii* NGR234. Las deformaciones en los pelos radicales se señalan con flechas. Barra = 50 μ m) (g) Los porcentajes de los pelos radicales con deformaciones se contaron en la zona de diferenciación/maduración de la raíz principal en las plantas RMh y PhL tratadas con los factores Nod (n=5).

El tratamiento con factores Nod indujo un porcentaje de pelos deformes significativamente mayor en plantas PhL y J5hLeGCM comparado con las plantas RMh y RMheG ($P < 0.0001$) (Figura 18, Cuadro 7). Este resultado sugiere que la expresión de los genes involucrados en la percepción de los factores Nod en las plantas PhL le confieren la capacidad de reconocer las señales de nodulación más efectivamente.

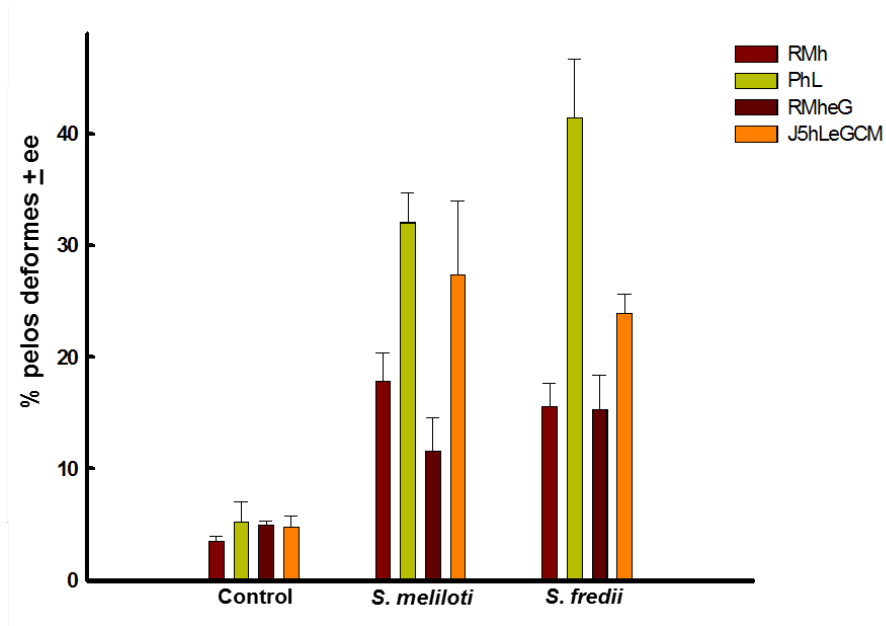


Fig. 18 Porcentaje de los pelos radicales deformes de la zona de diferenciación/maduración de la raíz principal en plantas tratadas con factores Nod. Plantas RMh, PhL, RMheG y J5hLeGCM se trataron con CHAPS (0.001%, control) o con factores de nodulación (1×10^{-9} M) de *S. meliloti* 1021 o *S. fredii* NGR234 (n=5).

Cuadro 7. Análisis comparativo del porcentaje de pelos radicales deformes en plantas de arroz en respuesta al tratamiento con factores de nodulación.

Comparaciones de los tratamientos con FN	t-value	P-value	
RMheG-J5hLeGCM; control vs Sm-Sf	-6.256	8.74E-08	***
RMh-PhL; control vs Sm-Sf	-7.769	3.79E-10	***
RMh-PhL; Sm vs Sf	0.492	0.62518	n.s.
RMheG-J5hLeGCM; Sm vs Sf	-1.078	0.28599	n.s.
RMh-RMheG, Sm-NGR vs PhL-J5hLeGCM, Sm-Sf	-6.351	6.22E-08	***
PhL-J5hLeGCM, Sm vs Sf	-0.348	0.72902	n.s.
RMh-RMheG, control vs PhL-J5hLeGCM, control	-0.26	0.79583	n.s.
PhL, Sf vs J5hLeGCM, Sf	2.779	0.00765	**
PhL, Sm vs J5hLeGCM, Sm	0.061	0.95137	n.s.
Residual standard error: 5.555 on 50 degrees of freedom Multiple R-squared: 0.7648, Adjusted R-squared: 0.7225 F-statistic: 18.07 on 9 and 50 DF, p-value: 7.126e-13			

5.3.5 Análisis de la expresión de genes en respuesta a factores Nod

Para conocer la expresión diferencial de los genes y las vías de señalización potencialmente involucradas en la respuesta al tratamiento con los factores Nod se realizó el análisis del transcriptoma de las muestras de ARN de raíces de (A) Plantas control RMh tratadas con CHAPS (0.001%), (B) plantas control RMh tratadas con factores Nod de *S. meliloti* 1021, (C) Plantas PhL tratadas con CHAPS (0.001%) y (D) Plantas PhL tratadas con factores Nod de *S. meliloti* 1021.

Se generaron cerca de 24 millones de lecturas de las bibliotecas de ARN para cada tratamiento, de ellas el 80% se alineó en una sola posición en el genoma de arroz, el 5% se alineó en múltiples posiciones. Alrededor del 65% de las lecturas se alinearon completamente y el 18% se aceptó con menos de dos bases no apareadas. Los genes diferencialmente expresados (GED) se seleccionaron de acuerdo con un $FDR \leq 0.001$ y $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1.5$. Los cambios en el transcriptoma debidos a la expresión *per se* de la expresión de los transgenes se obtuvieron con la comparación de los datos transcriptómicos de las plantas PhL vs RMh (C/A). Para analizar la respuesta a los factores Nod en las plantas control RMh y PhL se evaluó la expresión diferencial de genes por separado RMh vs RMh + factores Nod (B/A) y PhL vs PhL + factores Nod (D/C) (Figura 19).

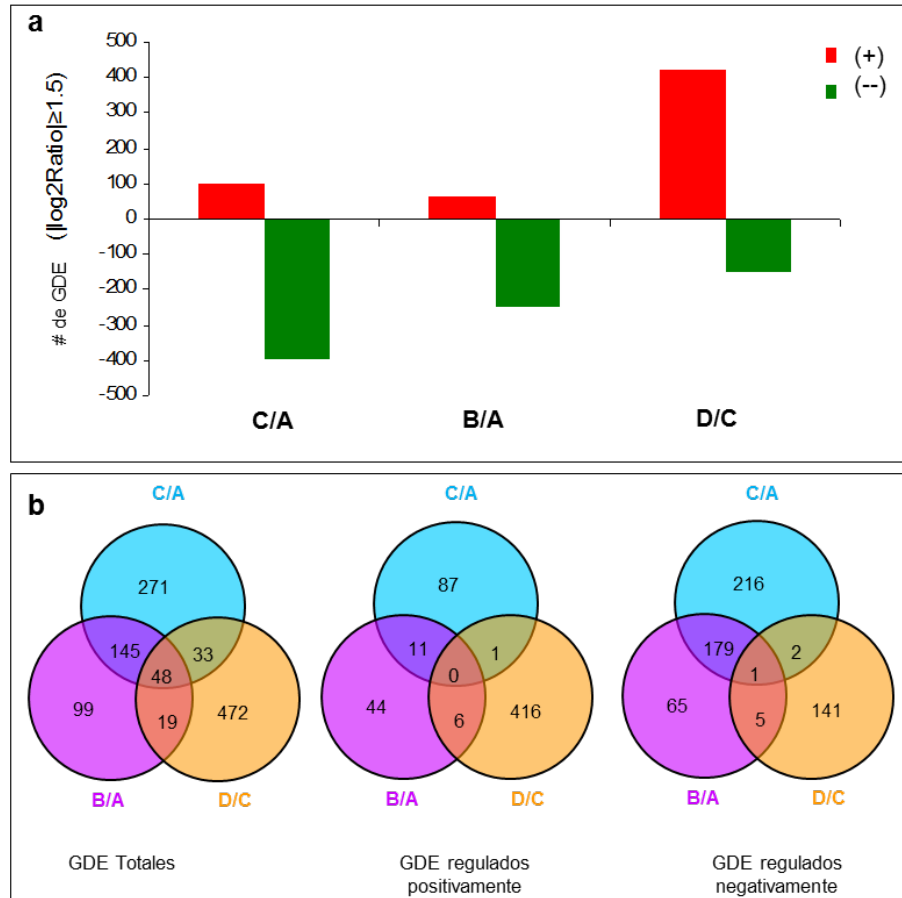


Fig. 19 Análisis por RNA-seq de raíces de arroz tratadas con factores Nod. (a) Genes regulados positiva y negativamente ($|\log_2\text{ratio}| \geq 1.5$) en raíces de plantas control RMh y PhL tratadas con o sin factores Nod. (b) Diagramas de Venn que muestra el sobrelape de los genes diferencialmente expresados en plantas de arroz en respuesta al tratamiento con factores Nod. Genes diferencialmente expresados en las raíces de plantas PhL vs control RMh (C/A), Plantas RMh tratadas con factores Nod vs plantas RMh no tratadas (B/A) y plantas PhL tratadas con factores Nod vs plantas PhL no tratadas (D/C).

El análisis del transcriptoma mostró que la expresión de los transgenes en las plantas PhL regularon negativamente la expresión en la raíz de 398 genes y activaron la expresión de 99 genes comparado con la planta control RMh (C/A) (Figura 19). El tratamiento con factores Nod activó un gran número de genes en las plantas PhL (D/C) comparado con la respuesta observada en plantas control RMh (B/A) (Figura 19).

Los genes regulados negativamente por la expresión de los transgenes en las plantas PhL (C/A) fueron principalmente factores transcripcionales (5 activados/24 inhibidos), proteínas cinasas (5 activados/22 inhibidos), y de enlace a calcio (1 activados/5 inhibidos), asociadas a procesos biológicos y relacionados con la interacción planta-patógeno, respuesta de defensa y vías biosintéticas de metabolitos secundarios y fitorreguladores (Figura 20 y 21). El tratamiento con factores Nod modificó drásticamente la expresión de genes en las plantas PhL (D/C) induciendo principalmente factores transcripcionales (19 activados/4 inhibidos), proteínas cinasas (41 activados/7 inhibidos) y de enlace a calcio (8 activados/1 inhibido) asociadas a vías de transducción de señales y síntesis de fitoreguladores (Figura 20).

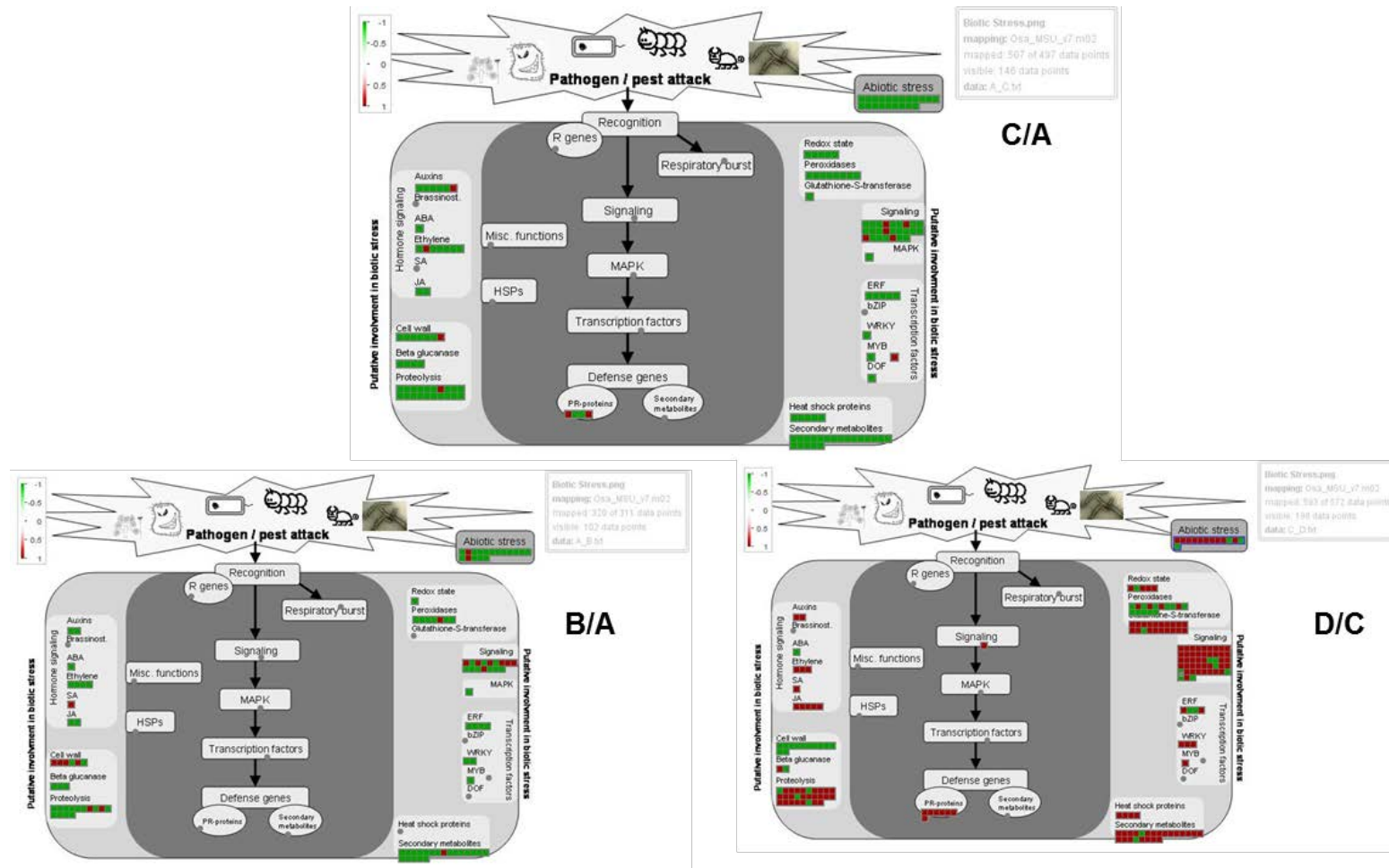


Fig. 20 Diagrama de MapMan 3.5 que muestra los genes diferencialmente expresados y que están relacionados con estrés biótico en raíces RMh y PhL tratadas o no con factores Nod. Plantas PhL vs RMh (C/A), Plantas RMh tratadas con factores Nod vs plantas RMh no tratadas (B/A) y plantas PhL tratadas con factores Nod vs plantas PhL no tratadas (D/C). Rojo: regulados positivamente y Verde: regulados negativamente.

El tratamiento con factores Nod en plantas PhL activó vías de señalización asociadas con respuesta de defensa, principalmente los involucrados en la interacción planta-patógeno y síntesis de metabolitos secundarios (fenilpropanoides, isoflavonoides, flavonoides, diterpenoides, estilbenoides, glutatión, y otros) y señalización de fitoreguladores y transportadores ABC (Figura 21).

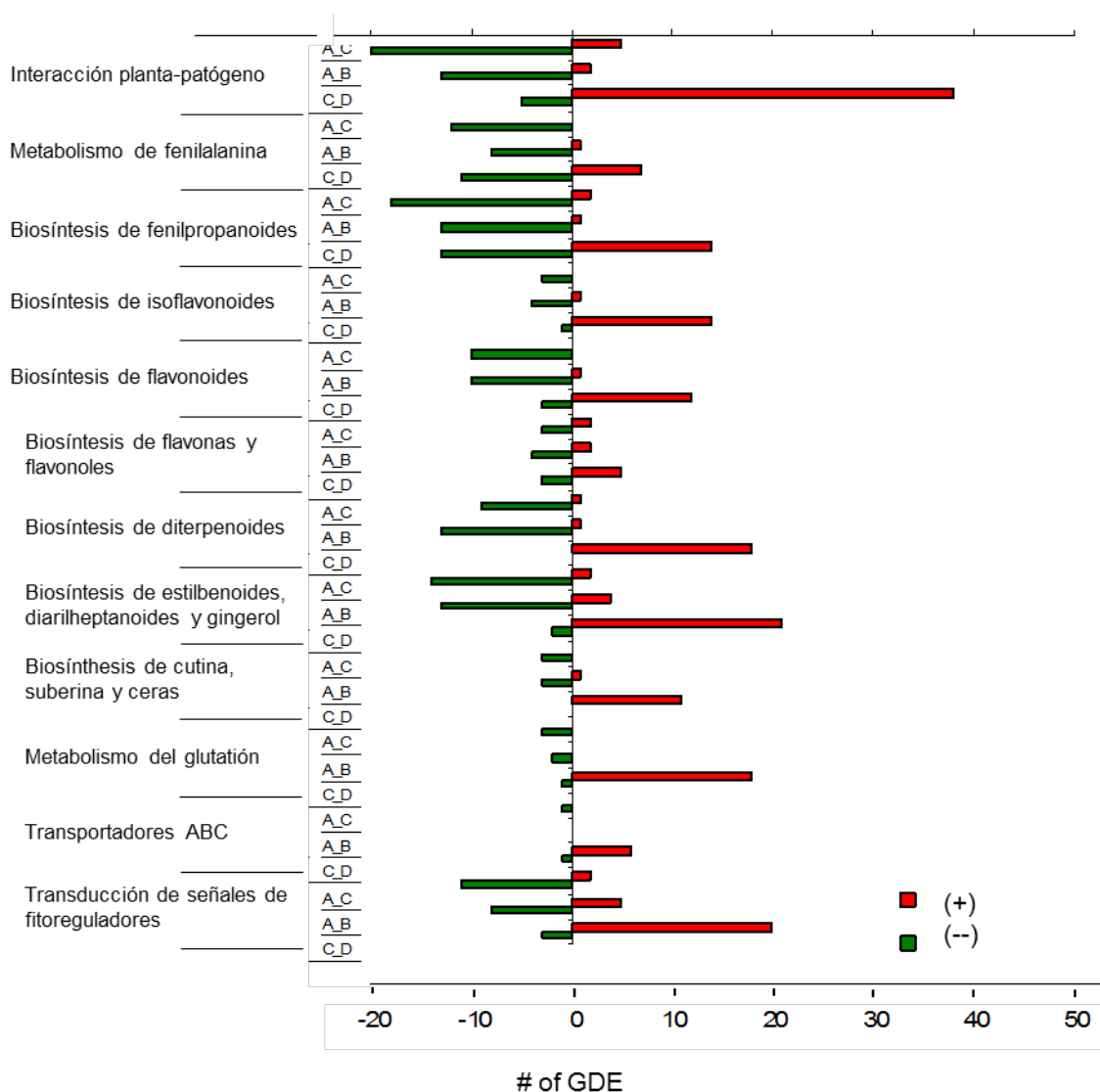


Fig. 21 Análisis KEGG de las vías de señalización afectadas en las raíces de plantas RMh y PhL tratadas o no con factores Nod. (C/A) plantas PhL vs RMh, (B/A) Plantas RMh tratadas con factores Nod vs plantas RMh no tratadas y, (D/C) plantas PhL tratadas con factores Nod vs plantas PhL no tratadas.

Los niveles de expresión de genes homólogos involucrados en la vía de señalización de la nodulación en leguminosas como *OsLYK3* (LOC_Os08g42580), *OsNFP* (LOC_Os03g13080), *OsSYMRK* (LOC_Os07g38070), *OsPOLLUX* (LOC_Os01g64980), *OsCASTOR* (LOC_Os03g62650), *OsNUP133* (03g12450), *OsNUP85* (LOC_Os01g54240), *OsCCaMK* (LOC_Os05g41090), *OsCYCLOPS* (LOC_Os06g02520), *OsNSP1* (LOC_Os03g29480), *OsNSP2* (LOC_Os03g15680) y *OsERN1* (LOC_Os07g10410) fue baja tanto en las plantas RMh (control) como en PhL y dicha expresión no se afectó por el tratamiento con factores Nod.

5.3.6 Validación de la expresión de genes específicos en respuesta a factores Nod por amplificación en tiempo real

Los resultados de los análisis transcriptómicos se validaron mediante la amplificación en tiempo real (RT-qPCR) de ocho genes activados en las raíces de plantas PhL tratadas con factores Nod que incluyen: Nicotianamina sintasa (LOC_Os03g19420), Proteína Expresada (LOC_Os02g33070), Glutación S-transferasa GSTU6 (LOC_Os10g38340), Oxido-reductasa, roteína de la familia aldo/ceto reductasa (LOC_Os04g27060), proteína antiportadora de la Super familia facilitadora principal (LOC_Os11g04020), proteína expresada 2 (LOC_Os08g05960), Transcetolasa (LOC_Os07g09190) 544 y proteína B12D (LOC_Os07g41350) (Figura 22).

La expresión de los genes seleccionados mediante la amplificación en tiempo real confirmó los resultados encontrados en el análisis del transcriptoma (Figura 22).

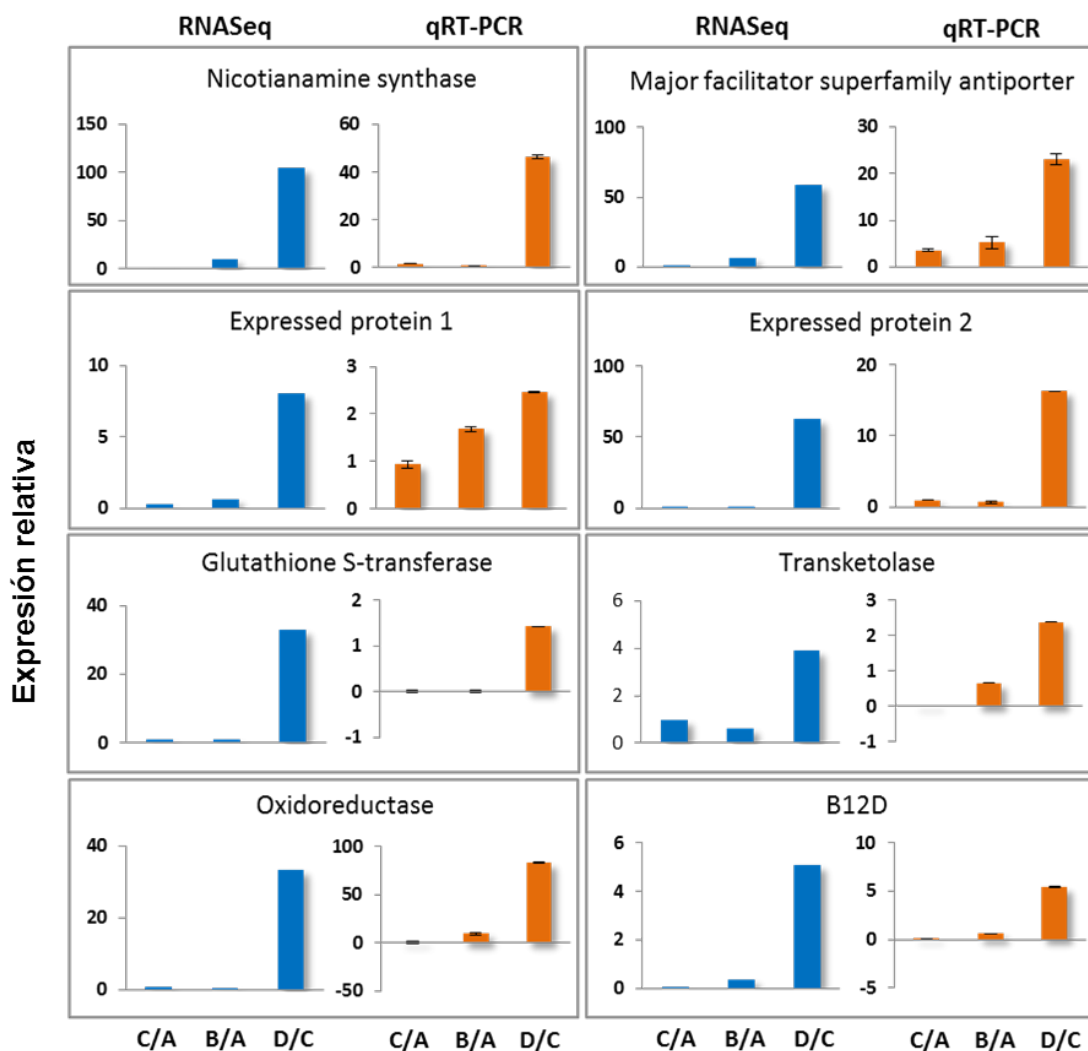


Fig. 22 Validación de los perfiles de expresión de genes por RT-qPCR. A la izquierda de cada gráfico se muestran los resultados de los niveles de expresión obtenidos vía análisis de secuenciación masiva, y a la derecha se muestra la expresión del mRNA por RT-qPCR y en la parte superior el nombre del gen correspondiente. Los valores de expresión relativa en RT-qPCR se calcularon con base en la expresión de genes de referencia (valor de expresión igual a 1). Se analizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas por cada condición. El ARN total de las raíces se obtuvo de las plantas en las siguientes condiciones: A: control RMh, B:RMh + factores Nod, C: PhL, D: PhL + factores Nod. Los números de accesoión de los genes de arroz analizados son los siguientes: Nicotianamine synthase (LOC_Os03g19420.2), Major facilitator superfamily antiporter (LOC_Os11g04020.1), Expressed protein 1 (LOC_Os02g33070.1), Expressed protein 2 (LOC_Os08g05960.1), Glutathione S-transferase (LOC_Os10g38340.1), Transketolase (LOC_Os07g09190.1), Oxidoreductase (LOC_Os04g27060.1), B12D (LOC_Os07g41350.1).

5.3.7 Evaluación de la actividad nitrogenasa en raíces de arroz inoculadas con bacterias rizobiales

La actividad nitrogenasa se evaluó mediante el método de la reducción de acetileno en las plantas RMh y PhL inoculadas o no (control) con *S. meliloti*-DG77-FITA-pHER y en ausencia de nitrógeno (ver detalles en metodología). No se observó actividad nitrogenasa en las plantas inoculadas y en las control a los 15 días después de la inoculación.

6. Discusión

Las interacciones entre plantas y microorganismos son sumamente complejas y reguladas en distintos niveles. Las plantas tienen mecanismos moleculares que les permiten promover asociaciones benéficas y defenderse de aquellas que les resulten nocivas (Plett y Martin, 2018). Dependiendo del tipo de organismo, la planta puede presentar, en caso de un organismo patógeno, una respuesta hipersensible que resulte en un fenotipo de resistencia, mientras que, con un microorganismo mutualista permitirá su establecimiento y supervivencia (Plett y Martin, 2018). Toda interacción entre plantas y microorganismos es finamente iniciada por compuestos químicos y sus respectivos receptores (Zipfel y Oldroyd, 2017). Posterior al reconocimiento, existen mecanismos específicos de transducción de señales como los niveles de calcio intracelular que juegan un papel importante en la respuesta de la planta (Yuan et al., 2017). La especificidad de la respuesta mediada por los niveles de calcio depende de la amplitud, duración, frecuencia, localización y la activación selectiva de proteínas específicas (Vadassery y Oelmüller, 2009).

Las plantas de arroz son capaces de desarrollar la simbiosis con micorriza, y varios de los genes de la vía simbiótica común leguminosa-rizobia y planta-micorriza son conservados en arroz y son funcionalmente activos, dado que pueden complementar el fenotipo de nodulación en las leguminosas mutantes correspondientes (Banba et al., 2008; Gutjahr et al., 2008; Chen et al., 2007, 2008, 2009; Yano et al., 2008; Markmann et al., 2008; Yokota et al., 2010; Reddy et al., 2013). Actualmente, se conocen muchos genes que codifican a proteínas involucradas en la señalización temprana de la nodulación y sus homólogos en arroz (Cuadro 1), pero la expresión de los genes esenciales para la percepción/señalización de los factores Nod en las plantas de arroz constituye un trabajo pionero en la complementación de la vía de señalización de la fijación biológica de nitrógeno en cereales. En plantas de arroz transformadas con el promotor ENOD12P-Gus se demostró que los factores Nod indujeron la actividad de la nodulina 12 (ENOD 12) en las raíces, aunque diferente a la observada en leguminosas (Reddy et al., 1998b). La expresión de la forma autoactiva de *CCaMK* en leguminosas produce nódulos independientemente de la percepción de los factores Nod o de la

presencia de los rizobios (Gleason et al., 2006). La expresión de *MtCCaMK* autoactiva en arroz no produjo la formación de estructuras tipo nódulos, pero sí incrementó la micorrización e indujo la expresión de los genes *OsCCaMK/DMI3*, *OsIPD3/CYCLOPS* y *OsNSP1* (Ortíz-Berrocal et al., 2017). Estos resultados sugieren que en arroz no es posible prescindir de la presencia de los genes tempranos de la nodulación que actúan previamente a CCaMK como sucede en leguminosas, o que otros componentes de la vía de señalización posteriores a CCaMK no están presentes en arroz.

Nuestros resultados mostraron que las plantas de arroz transformadas con genes codificantes de proteínas involucradas en la percepción de factores Nod en leguminosas fueron capaces de reconocer y responder a las señales rizobiales en mayor porcentaje que las plantas control. Las inoculaciones rizobiales y el tratamiento con factores de nodulación produjeron deformaciones de pelos radicales (Figuras 15-18) y la expresión diferencial de muchos genes en las plantas transformadas *versus* las plantas control (Figuras 19-21). El tratamiento con factores Nod en plantas transformadas con los receptores de factores de nodulación (PhL) indujo la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con la respuesta de defensa e interacción planta-patógeno (Figura 21). La activación de genes de defensa en respuesta al tratamiento con factores Nod en las plantas que expresaron los receptores de factores Nod puede explicar por qué en estas plantas se observó una menor colonización de las bacterias rizobiales comparado con las plantas control (Figuras 13 y 14). La coexpresión heteróloga de *MtLYK3* y *MtNFP* en *Nicotiana benthamiana* Domin (Solanales: Solanaceae) también incrementó la expresión de genes de defensa, la acumulación de compuestos fenólicos y muerte celular (Pietraszewska-Bogiel et al., 2013). Además, la expresión de receptores quiméricos *AtCERK1* y 2 con dominios extracelulares de *LjNFR1* y *LjNFR5* en plantas de *Arabidopsis thaliana*, deficientes en *AtCERK1* y 2 indujo la producción de ROS, la expresión de genes de defensa a quitina y la resistencia a patógenos cuando las plantas se trataron con factores Nod (Wang et al., 2014). De hecho, NFP se ha reportado involucrado tanto en las respuestas simbióticas como en la inmune (Gough y Jacquet, 2013; Rey et al., 2013).

Es de particular interés el hecho de que las plantas transformadas con los receptores de nodulación y tratadas con factores Nod presenten niveles más altos de las vías de señalización en general y en particular la de fitoreguladores como las auxinas, etileno y ácido jasmónico (Figura 20). En las interacciones planta-microorganismo simbiote se ha reportado que los niveles de auxinas aumentan, pero que las vías de señalización de etileno, ácido jasmónico y ácido giberélico disminuyen (Plett y Martin 2018). Otro punto importante son las rutas de síntesis de metabolitos secundarios, particularmente de compuestos fenólicos y terpenos, los cuales también aumentan en las plantas transformadas con los receptores de nodulación tratadas con factores Nod en comparación al control (Figura 21). Las respuestas diferenciales de la planta ante un microorganismo benéfico o patógeno, en gran medida son reguladas por la acción de factores transcripcionales. Es bien conocido que los factores transcripcionales del tipo WRKY están involucrados en la vía de respuesta en contra de patógenos (Zipfel y Oldroyd 2017). Las plantas transformadas con los receptores de nodulación y tratadas con factores Nod presentan niveles más altos de los factores de transcripción WRKY, ERF y MYB en comparación con las plantas control (Figura 20). Estos resultados sugieren que las plantas transformadas con los receptores permiten el reconocimiento parcial de los factores Nod, quizá como parte del mecanismo general de reconocimiento de moléculas de tipo quitooligosacárido y no completamente asociado a la simbiosis fijadora de nitrógeno (Liang et al., 2013; Tanaka et al., 2015).

Ante un estímulo de factores Nod, en leguminosas inmediatamente se produce un incremento transitorio de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la ulterior alcalinización extracelular (Cárdenas et al., 2008; Radutoiu et al., 2003), similar a lo observado en la respuesta de defensa a patógenos (Zipfel et al., 2006). Es posible que algunos componentes de la señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno detengan la producción de ROS y la respuesta de defensa. Los factores Nod inducen la deformación de pelos radicales en leguminosas debido a la reactivación del crecimiento polar en los pelos radicales (Larrainzar et al., 2015). El enrollamiento de los pelos radicales permite la entrada de las bacterias rizobiales hacia las células corticales de la raíz a través del hilo de infección. En nuestro estudio, aunque las plantas control RMh mostraron

deformaciones en los pelos radicales, la respuesta se incrementó en las plantas PhL y J5hLeGCM que expresaron los genes receptores de factores Nod (Figuras 15 y 16). Otro factor importante es que en presencia de un microorganismo simbiote, las plantas responden favoreciendo el reblandecimiento de la pared celular que posiblemente está involucrado con la deformación de los pelos radicales (Plett y Martin 2018). Las plantas transformadas con los receptores de factores Nod presentan niveles inferiores de genes involucrados con la síntesis de la pared celular (Figura 20), lo cual es de esperarse si la expresión de los transgenes está funcionando adecuadamente en el reconocimiento de los factores Nod, permitiendo la deformación de la raíz.

Entre los efectos de la expresión de los receptores de factores Nod en plantas de arroz se destacó la eliminación/reducción significativa de la producción de semillas (Figura 11). Estudios de co-expresión transitoria de los genes *MtNFP* y *MtLYK3* o de ortólogos de *LjNFR5* y *LjNFR1* indujeron la muerte celular relacionada con la respuesta de defensa en hojas de tabaco y células epidermales de *Allium ampeloprasum* L. (Liliales: Amaryllidaceae) (Pietraszewska-Bogiel et al., 2013; Madsen et al., 2011). En nuestro estudio, se desconoce si la co-expresión de los genes *Mt-LYK3* y *MtNFP* en arroz no fue tan perjudicial como la observada en las hojas de tabaco en parte porque los receptores se expresaron junto con los genes *MtSYM-REM1* y *LjLNP* en PhL y *DMI2* en J5hLeGCM, o debido a que la expresión de los genes pudo ser variable y con diferentes efectos, ya que hubieron otras líneas de arroz transformadas con los receptores de factores Nod que sobrevivieron, pero no produjeron semillas. En nuestro trabajo utilizamos promotores constitutivos para asegurar la expresión de los transgenes, pero también puede resultar en una desventaja al ser expresados en toda la planta, y se afecten otros procesos biológicos de la misma.

De acuerdo con los resultados de nuestro trabajo, tanto plantas RMh (control) como las PhL y J5hLeGCM (expresando los receptores de factores Nod) son capaces de percibir las señales de la nodulación, pero dada la expresión diferencial de genes, se sugiere que mecanismos de señalización completamente diferentes están involucrados en la respuesta. Si la vía de señalización no continúa como en la simbiosis fijadora de

nitrógeno en leguminosas puede ser debido a la falta de otros componentes de la vía de señalización que den continuidad a la vía de señalización. Se requiere de más estudios que permitan conocer con mucho más detalle el mecanismo molecular de reconocimiento y transducción de la señal involucrado en la simbiosis fijadora de nitrógeno, con la finalidad de que a futuro se logre establecer dicha relación (arroz-rizobia).

7. Conclusión

La expresión de los receptores de factores Nod en arroz constituye uno de los primeros pasos en el establecimiento de la vía de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno en cereales. La expresión de los genes *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtSYMREM*, *LJLNP* y *MtDMI2* en plantas de arroz no incrementó la colonización de las bacterias rizobiales en las raíces, pero permitió avanzar en la obtención de las primeras señales de deformación en los pelos radicales en respuesta a los factores Nod. Las plantas transgénicas de arroz que expresaron los receptores de factores Nod mostraron una inducción de genes relacionados con la respuesta de defensa en respuesta al tratamiento con factores Nod, mostrando una vía de señalización distinta a la observada en las plantas control y en leguminosas.

8. Perspectivas

La señalización de calcio intracelular es esencial tanto en la respuesta simbiótica como en la de defensa a patógenos (Yuan et al., 2017). En este trabajo se generaron plantas con semillas que expresan los genes de señalización temprana de los factores Nod: *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtSYMREM*, *LjLNP* y *MtDMI2*, y un sensor de calcio (Cameleon 3.6), y posteriormente se obtuvieron las plantas control conteniendo solamente el sensor, por lo que sería de interés continuar con el análisis de la señalización de calcio intracelular en respuesta a las señales de nodulación.

Las respuesta a los factores de nodulación en las plantas de arroz transformadas con los receptores de factores Nod son diferentes a las observadas en leguminosas. Sería interesante comparar esa respuesta en un curso temporal ya que el análisis de la expresión diferencial de genes reveló que se induce una gran cantidad de genes relacionados con la respuesta de defensa, sin embargo, la planta finalmente no se muere. En leguminosas se observa también una respuesta de defensa inicial, que luego es revertida (Mithöfer, 2002), se desconoce si los mecanismos de defensa en las plantas transformadas de arroz permanecen inducidos en respuesta al tratamiento con los factores Nod u otros oligómeros de quitina.

Los receptores de factores Nod expresados en arroz también podrían estar involucrados en la respuesta simbiótica a MA (Op de Camp et al., 2011) o en la defensa a patógenos (Gough y Jacquet, 2013; Pietraszewska-Bogiel et al., 2013; Rey et al., 2013; Wang et al., 2014), por lo que sería de interés evaluar si su expresión confiere a la planta de mecanismos que favorezcan la simbiosis con MA o reduzcan su sensibilidad a distintas enfermedades. Además, sería interesante evaluar si la inoculación con bacterias rizobiales podría conferir alguna ventaja de crecimiento o producción en plantas adultas comparada con plantas control no inoculadas.

La expresión diferencial de genes y la falta de la respuesta simbiótica a los factores Nod en las plantas transgénicas de arroz, posiblemente sea debido a que la vía de

señalización simbiótica está incompleta, por lo que se sugiere complementar la cascada de señalización, por ejemplo con factores transcripcionales específicos de la nodulación (*NSP1*, *NSP2*, *ERN1*, *ERN2*, *ERN3*, *NIN*) que son poco conservados en arroz, pero que son esenciales en la señalización de la nodulación. La polinización cruzada entre plantas que contienen los genes receptores y los factores transcripcionales, con las que ya se cuenta actualmente, es una opción viable para continuar con la complementación de la vía de señalización de la nodulación en arroz.

9. Referencias

- Alexa A., Rahnenführer J.** (2016). TopGO: enrichment analysis for gene ontology. R package version 2280.
- Altúzar-Molina A., Hernández G., Reddy P.M.** (2018). Uso de la interacción entre los microorganismos del suelo y las plantas para mejorar la agricultura. *Hypatia* 60: 11-13.
- Ané J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E.D., Ajax C. Levy J., Debellé F., Baek J.M., Kalo P., Rosenberg C. Roe B.A. Long S.R., Dénarié J., Cook D.R.** (2004). *Medicago truncatula DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-1367.
- Arrighi J.F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Campos L.S., Mirabella R., Carvalho-Niebel F., Journet E.P., Gherardi M., Huguet T., Geurts R., Dénarié J., Rougé P., Gough C.** (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* 142: 265-279.
- Banba M., Gutjahr C., Miyao A., Hirochika H., Paszkowski U., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H.** (2008). Divergence of evolutionary ways among common *sym* genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 49: 1659- 1671.
- Beatty P.H., Good A.G.** (2011). Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science* 333: 416-417.
- Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S.** (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature* 3: 281-286.
- Ben Amor B., Shaw S.L., Oldroyd G.E.D., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Dénarié J., Gough C.** (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* 34: 495-506.
- Bersoult A., Camut S. Perhald A. Kereszt A., Kiss G.B., Cullimore J.V.** (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.
- Bozsoki Z., Cheng J., Feng F., Gysel K., Vinther M., Andersen K.R., Oldroyd G., Blaise M., Radutoiu S., Stougaard J.** (2017). Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 114: E8118-E8127.
- Buendia L., Wang T., Girardin A., Lefebvre B.** (2016). The LysM receptor-like kinase SI LYK 10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytol.* 210: 184-195.
- Burén S., Rubio L.M.** (2018). State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiol. Letter* 365: fnx274.
- Buchholz W.G., Xu Y., Snowden K.C., Yu H., Ambler J., Connell J.P., Wallace D., Tanaka K., Hall T.C.** (1996). Expression patterns of RCg2 and prolamine promoters in transgenic rice. *En Rice Genetics III: (In 2 Parts) Pp.* 710-716.

- Capoen W., Goormachtig S., De Rycke R., Schroeyers K., Holsters M.** (2005). SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 10369-10374.
- Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M.S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Domnie J.A., Morris R.J., Ané J.M., Oldroyd G.E.** (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 14348-14353.
- Cárdenas L., Domínguez J., Quinto C., López-Lara I.M., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P., Rademaker G.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29: 453-464.
- Cárdenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sánchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K.** (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol.* 123: 443-452.
- Cárdenas L., Martínez A., Sánchez F., Quinto C.** (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs) *Plant J.* 56: 802-813.
- Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Ba A., Gillis M., de Lajudie P., Dreyfus B.** (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5437-5447.
- Charpentier M., Bredemeier R., Wanner G., Takeda N., Schleiff E., Parniske M.** (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20: 3467-3479.
- Charron D., Pingret J.L., Chabaud M., Journet E.P., Barker D.G.** (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipids signaling pathways link Rhizobium nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific *ENOD* gene expression. *Plant Physiol.* 136: 3582-3593.
- Chen C., Gao M., Liu J., Zhu H.** (2007). Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 145: 1619-628.
- Chen C., Ane J.M., Zhu H.** (2008). OsIPD3, an ortholog of the *Medicago truncatula* DMI3 interacting protein IPD3, is required for mycorrhizal symbiosis in rice. *New Phytol.* 180: 311- 315.
- Chen C., Fan C., Gao M., Zhu H.** (2009). Antiquity and function of *CASTOR* and *POLLUX*, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol.* 149:306-317.
- Choi W.G., Swanson S.J., Gilroy S.** (2012). High-resolution imaging of Ca²⁺, redox status, ROS and pH using GFP biosensors. *Plant J.* 70: 118-128.
- Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H.** (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Chung S.M., Frankman E.L., Tzfira T.** (2005). A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 357-361.
- Crawley M.J.** (1993) *GLIM for ecologists*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Day R.B., McAlvin C.B., Loh J.T., Denny R.L. Wood T.C., Young N.D., Stacey G.** (2000). Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1053-1070.
- Dazzo F.B., Yanni Y., Rizk R., de Bruijn F.J., Rademaker J., Squartini A., Corich V., Mateos P., Martinez-Molina E., Velazquez E., Biswas J.C., Hernandez R.J., Ladha, J.K., Hill J., Weinman J., Rolfe B.G., Vega-Hernandez M., Bradford J.J., Hollingsworth R.I., Ostrom P., Marshall E., Jain T., Orgambide G., Philip-Hollingsworth S., Triplett E., Malik K.A., Maya-Flores J., Hartmann A., Umali-Garcia M., Izaguirre-Mayoral M.L.** (2000). Progress in multinational collaborative studies on the beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice. En: Ladha J.K., Reddy P.M. (Eds.) *The quest of nitrogen fixation in rice*. Los Banos: International Rice Research Institute. Pp. 167-189.
- De Mita S., Streng A., Bisseling T., Geurts R.** (2014). Evolution of a symbiotic receptor through gene duplications in the legume–rhizobium mutualism. *New Phytol.* 201: 961-972.
- Dekeyser R., Claes B., Marichal M., Van Montagu M., Caplan A.** (1989). Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiol.* 90: 217-223.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Dénarié J., Debelle F.** (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharides nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Desaki Y., Miya A., Venkatesh B., Tsuyumu S., Yamane H., Kaku H., Minami E., Shibuya N.** (2006). Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* 47: 1530-1540.
- Desaki Y., Kouzai Y., Ninomiya Y., Iwase R., Shimizu Y., Seko K., Molinaro A., Minami E., Shibuya N., Kaku H., Nishizawa Y.** (2018). *OsCERK 1* plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. *New Phytol.* 217: 1042-1049.
- Dolgikh E.A., Leppyanen I.V., Zhukov V.A., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A.** (2011). Expression of *Pisum sativum* recombinant receptor proteins Sym10 and Sym37 involved in perception of lipochitooligosaccharide nod factors. *Russian J. Genet. Appl. Res.* 1, 335.
- Endre G. Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
- Engelhard M., Burek T., Reinbold-Burek B.** (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern rice. *Environ. Microbiol.* 2: 131-141.
- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Guillén G., Diaz-Camino C., Campos F., Quinto C., Gresshoff P.M., Sanchez F.** (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols* 2: 1819.

- Etzler M.E., Kalsi G., Ewing N.N., Roberts N.J., Day R.B., Murphy J.B.** (1999). A Nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5856-5861.
- Genre A., Chabaud M., Balzergue C., Puech-Pages V., Novero M., Rey, T., Fournier J., Rochange S., Becard G., Bonfante P., Barker D.G.** (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198: 190-202.
- Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Autran D., Giczey G., Auguy F., Péret B., Laplaze L., Franche C., Parniske M., Bogusz D.** (2008). SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiabacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4928-4932.
- Geurts R., Bisseling T.** (2002). *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* S239-S249.
- Geurts R., Fedorova E., Bisseling T.** (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Science* 8: 346-452.
- Gleason C., Chaudhuri S., Yang T., Muñoz A., Poovaiah B.W., Oldroyd G.E.D.** (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441: 1149–1152.
- Goff S.A. Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colnert M., Sun W.L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.D., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tumeem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier F.** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18: 2680-2693.
- Gough C., Jacquet C.** (2013). Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions. *Trends in Plant Science* 18: 566-574.
- Groth M., Takeda N., Perry J., Uchida H., Draxl S., Brachmann A., Sato S., Tabata S., Kawaguchi M., Wang T.L., Parniske M.** (2010). *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of *Sec13*, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22: 2509-2526.
- Gutjahr C., Banba M., Croset V., An k., Miyao A., An G., Hirochica H., Imaizumi-Anraku H., Paszkowski U.** (2008). Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20: 2989-3005.

- Haney C.H., Long S.R.** (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 478-483.
- Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C.** (1968). The acetylene ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- He J., Zhang C., Dai H., Liu H., Zhang X., Yang J., Chen X., Zhu Y., Wang D., Qi X., Li W., Wang Z., An G., Yu N., He Z., Wang Y.F., Xiao Y., Zhang P., Wang E.** (2019). A LysM receptor heteromer mediates perception of arbuscular mycorrhizal symbiotic signal in rice. *Mol. Plant* 12: 1561-1576.
- Heckmann A.B., Lombardo F., Miwa H., Perry J.A., Bunnell S., Parniske M., Wang T., Downie J.A.** (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domains regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* 142:1739-1750.
- Hernández G., Ramírez M., Valdes-Lopez O., Tesfaye M., Graham M.A., Czechowski T., Schlereth A., Wandrey M., Erban A., Cheung F., Wu H.C., Lara M., Town C.D., Kopka J., Udvardi M.K., Vance C.P.** (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol.* 144: 752-767.
- Hirsch S., Kim J. Muñoz A., Heckmann A.B., Downie J.A., Oldroyd G.E.D.** (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21: 545-557.
- Hirsch S., Oldroyd G.** (2009). Integrated Nod factor signaling in plants. En Baluska F., Mancuso S. (Eds.) *Signaling and communication in plants*. Springer. Germany.
- Hochholdinger F., Park W.J., Sauer M., Woll K.** (2004). From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 9:42-48.
- Huisman R., Geurts R.** (2020). A roadmap toward engineered nitrogen-fixing nodule symbiosis. *Plant Comm.* 1, 100019.
- Imaizumi-Anraku H., Takeda N., Charpentier M., Perry J., Miwa H., Umehara Y., Kouchi H., Murakami Y., Mulder L., Vickers K., Pike J., Downie J.A., Wang T., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Yoshikawa M., Murooka Y., Wu G.J., Kawaguchi M., Kawasaki S., Parniske M. Hayashi M.** (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433: 527-531.
- Jang I.C., Choi W.B., Lee K.H., Song S.I., Nahm B.H., Kim J.K.** (2002). High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene *OsCc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiol.* 129: 1473-1481.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga E., Walter G.C.** (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature* 5: 619-633.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 11086-11091.

- Kalo P., Gleason C., Edwards A., Marsh J., Mitra R.M., Hirsch S., Jakab J., Sims S., Long S.R., Rogers J., Kiss G.B., Downie J.A., Oldroyd G.E.D.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-1789.
- Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E.M.H., Miwa H., Downie J.A., James E.K., Felle H.H., Lindegaard-Hanning L., Heick Jensen T., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 359-364
- Kevei Z., Loughnon G., Mergaert P., Horváth G.V., Kereszt A., Jayaraman D., Zaman N., Marcel F., Regulski K., Kiss G.B., Kondorosi A., Endre G., Kondorosi E., Ané J.M.** (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19: 3974-3989.
- Kouchi H., Takane K., So R.B., Ladha J.K., Reddy P.M.** (1999). Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J.* 18: 121-129.
- Ladha J.K., Reddy P.M.** (2000). Steps toward nitrogen fixation in rice. En Ladha J.K., Reddy P.M., (Eds.) *The quest for nitrogen fixation in rice*. International Rice Research Institute, Makati, Philippines.
- Ladha J.K., Pathak H., Krupnik T.J., Six J., van Kessel C.** (2005). Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. *Adv. Agron.* 87: 85-156.
- Larrainzar E., Riely B.K., Kim S.C., Carrasquilla-Garcia N., Yu H.-J., Hwang H.-J., Oh M., Kim G.B., Surendrarao A.K., Chasman D., Siahpirani A.F., Penmetsa R.V., Lee G.-S., Kim N., Roy S., Mun J.-H., Cook D.R.** (2015). Deep Sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant Physiol.* 169: 233-265.
- Lefebvre B., Timmers T., Mbengue M., Moreau S., Hervé C., Tóth K., Bittencourt-Silvestre J., Klaus D., Deslandes L., Godiard L., Murray J.D., Udvardi M.K., Raffaele S., Mongrand S., Cullimore J., Gamas P., Niebel A., Ott T.** (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 2343-2348.
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ané J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debelle F.** (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1363.
- Liang Y., Cao Y., Tanaka K., Thibivilliers S., Wan J., Choi J., Kang Ch., Qiu J., Stacey G.** (2013). Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* 341:1384-1387.
- Limpens E., Bisseling T.** (2003). Signaling in symbiosis. *Curr. Op. Plant Biol.* 6: 343-350.
- Limpens E., Franken C., Smith P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R.** (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Nature* 302: 630-633.

- Liu C.W., Murray J.D.** (2016). The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. *Plants* 5, 33.
- Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Fan F., Wang J., Jin C., Chang J., Zhou J.M., Chai J.** (2012). Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* 336: 1160-1164.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Long S.R.** (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.
- Macho A.P., Zipfel C.** (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* 54: 263–272
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640.
- Madsen E.B., Antolin-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S., Jensen O.N., Stougaard J., Parniske M.** (2011). Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J.* 65: 404-417.
- Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pages V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martínez E.A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J.** (2011). Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-63.
- 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: e68.
- Markmann K., Parniske M.** (2009). Evolution of root endosymbiosis with bacteria: How novel are nodules? *Trends Plant Sci.* 14: 77-86.
- Marsh J.F., Rakocevic A., Mitra R.M., Brocard L., Sun J., Eschstruth A., Long S.R., Schultze M., Ratet P., Oldroyd G.E.** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144: 324-335.
- Messinese E., Mun J.H., Yeun L.H., Jayaraman D., Rouge P., Barre A., Lougnon G., Schornack S., Bono J.J., Cook D.R., Ané J.** (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 912-921.
- McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R.** (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.
- Miller J.B., Pratap A., Miyahara A., Zhou L., Bornemann S., Morris R. J., Oldroyd G.E.** (2013). Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *Plant Cell* 25: 5053-5066.

- Mithöfer A.** (2002). Suppression of plant defence in rhizobia–legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* 7: 440-444.
- Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie A., Oldroyd G.E.D., Long S.R.** (2004). A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 4701-4705.
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G.E.D., Downie J.A.** (2006). Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J.* 48: 883-894.
- Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y., Ozawa K., Ishii K., Asamizu E., Okabe Y., Umehara Y., Miyamoto A., Kobae Y., Akiyama K., Kaku H., Nishizawa Y., Shibuya N., Nakagawa T.** (2014). The bifunctional plant receptor, *OsCERK1*, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.* 55: 1864-1872.
- Miyata K., Hayafune M., Kobae Y., Kaku H., Nishizawa Y., Masuda Y., Shibuya N., Nakagawa T.** (2016). Evaluation of the Role of the LysM receptor-like kinase, *OsNFR5/OsRLK2* for AM symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.* 57: 2283-2290.
- Morita S., Nemoto K.** (1995). Morphology and anatomy of rice roots with special reference to coordination in organo-and histogenesis. En: *Structure and function of roots*. Springer, Dordrecht. Pp. 75-86.
- Muthayya S., Sugimoto J.D., Montgomery S., Maberly G.F.** (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1324: 7-14.
- Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouch H.** (2011). From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume–Rhizobium symbiosis. *Plant J.* 65: 169-180.
- Narsai R., Ivanova A., Ng S., Whelan J.** (2010). Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. *BMC Plant Biol.* 10: 56
- Odell J.T., Nagy F., Chua N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810–812.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A.** (2004). Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 566-576.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-546.
- Oldroyd G.E., Dixon R.** (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Op. Biotech.* 26, 19-24.
- Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.** (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45: 119-144.

- Op den Camp R., Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., Ammiraju J.S.S., Kudrna D., Wing R., Untergasser A., Bisseling T., Geurts R. (2011).** LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* 331: 909-912.
- Ortiz-Berrocal M., Lozano L., Sanchez-Flores A., Nava N., Hernández G., Reddy P.M. (2017).** Expression in rice of an autoactive variant of *Medicago truncatula* DMI3, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from the common symbiotic pathway modifies root transcriptome and improves mycorrhizal colonization. *Plant Biotechnol. Rep.* 11: 271-287.
- Parniske M. (2008).** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature* 6: 763-775.
- Perrine-Walker F.M., Prayitno J., Rolfe B.G., Weinman J.J., Hocart C.H. (2007).** Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 58: 3343-3350.
- Pietraszewska-Bogiel A., Lefebvre B., Koini M.A., Klaus-Heisen D., Takken F.L.W., Geurts R., Cullimore J.V., Gadella T.W.J. (2013).** Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, *NFP* and *LYK3*, produced in *Nicotiana benthamiana* induces defence-like responses. *PLoS one* 8, e65055.
- Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. (2011).** MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 65: 622-633.
- Plett J.M., Martin F.M. (2018).** Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *Plant J.* 93: 729-746.
- Prayitno J., Stefaniak J., Mciver J., Weinman J.J., Dazzo F.B., Ladha J.K., Barraquio W., Yanni Y.G., Rolfe B.G. (1999).** Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 521-535.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Grønlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2003).** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard M.H., Albrechtsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J. (2007).** LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. *Europ. Mol. Biol. Organ.* 26: 3923-3935.
- Ramírez M., Guillen G., Fuentes S.I., Iniguez L.P., Aparicio-Fabre R., Zamorano-Sanchez D., Encarnacion-Guevara S., Panzeri D., Castiglioni B., Cremonesi P., Strozzi F., Stella A., Girard L., Sparvoli F., Hernández G. (2013).** Transcript profiling of common bean nodules subjected to oxidative stress. *Physiol. Plant.* 149: 389-407.
- Rebouillat J., Dievart A., Verdeil J.L., Escoute J., Giese G., Breitler J.C., Gantet P., Espeout S., Guiderdoni E., Périn, C. (2009).** Molecular genetics of rice root development. *Rice* 2: 15-34.
- Reddy P.M., Ladha J.K., So R.B., Hernández J.K., Ramos M.C., Angeles O.R., Dazzo F.B., de Bruijn F.J. (1997).** Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant Soil* 194: 81-98.

- Reddy P.M., Kouchi H., Ladha J.K.** (1998^a). Isolation, analysis and expression of homologues of the soybean early nodulin gene *GmENOD93* (*GmN93*) from rice. *Biochim. Biophys. Acta* 1443: 386-392.
- Reddy P.M., Ladha J.K., Ramos M.C., Maillet F., Hernández R.J., Torrizo L.B., Oliva N.P., Datta S.K., Datta K.** (1998^b). Rhizobial lipochitooligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulin gene *ENOD12* in rice. *Plant J.* 14: 693-702.
- Reddy P.M., Aggarwal R.K., Ramos M.C., Ladha J.K., Brar D.S., Kouchi H.** (1999). Widespread occurrence of the homologues of the early nodulin (*ENOD*) genes in *Oryza sativa* species and related grasses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 148-154.
- Reddy P.M., Ladha J.K.** (2000). Realizing the genetic predisposition of rice for symbiotic nitrogen fixation. En: Ladha J.K., Reddy P.M., (Eds.) *The quest for nitrogen fixation in rice*. International Rice Research Institute, Makati, Philippines.
- Reddy P.M., James E.K., Ladha J.K.** (2002). Nitrogen fixation in rice. En: Leigh G.J. (Ed.) *Nitrogen fixation at the millenium*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, Pp. 421-445.
- Reddy P.M., Altúzar-Molina A.R., Ortiz-Berrocal M., Medina-Andrés R., López-Sámano M., Martínez-Aguilar L., Velázquez-Hernández M.D.L.** (2013). Predisposition and redesigning of genetic networks of rice for accommodating nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. En: Muralidharan K, Siddiq EA (Eds.) *International Dialogue on Perception and Prospects of Designer Rice*. Society for Advancement of Rice Research, Directorate of Rice Research, Hyderabad, India, Pp. 245-257.
- Rey T., Nars A., Bonhomme M., Bottin A., Huguet S., Balzergue S., Jardinaud M.F., Bono J.J., Cullimore J., Dumas B., Gough C., Jacquet C.** (2013). NFP, a Lys M protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytol.* 198: 875-886.
- Rich S.M., Watt M.** (2013). Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *J. Exp.Bot.* 64: 1193-1208.
- Ridge R.W., Ride K.M., Rolfe B.G.** (1993). Nodule-like structures induced on the roots of rice seedlings by addition of the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 705-17.
- Roberts N.J., Morieri G., Kalsi G., Rose A., Stiller J., Edwards A., Xie F., Gresshoff P.M., Oldroyd G.E.D., Downie J.A., Etzler M.E.** (2013). Rhizobial and mycorrhizal symbioses in *Lotus japonicus* require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiol.* 161: 556-567.
- Rogers C., Oldroyd G.E.D.** (2014). Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J. Exp. Bot.* 65: 1939-1946.
- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y.** (2007). *NUCLEOPORIN85* is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbiosis, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19: 610-624.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

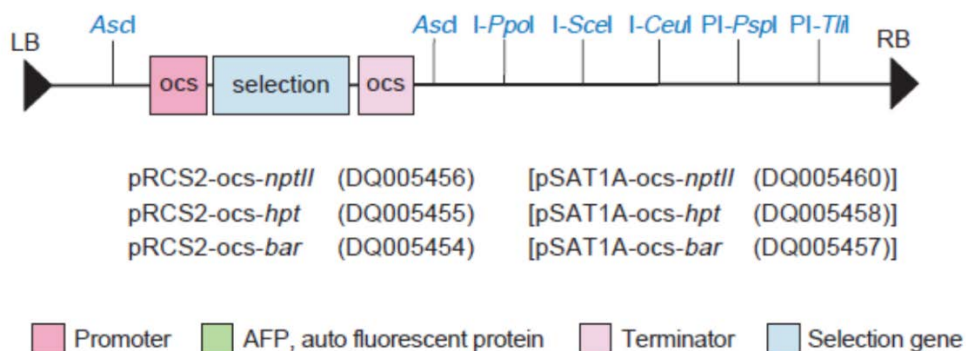
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195.
- Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki Y., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Minami E., Okada K., Yamane H., Kaku H., Shibuya N.** (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.* 64:204–214.
- Singh S., Katzer K., Lambert J., Cerri M., Parniske M.** (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 15: 139-152.
- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debelle F., Gough C., Bisseling T., Geurts R.** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-1791.
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T.** (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.* 145: 183-191.
- Soyano T., Kouchi H., Hirota A., Hayashi M.** (2013). Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* 9, e1003352.
- Sreevidya V.S., Hernández-Oane R.J., So R.B., Sullia S.B. Stacey G., Ladha J.K., Reddy P.M.** (2005). Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Sci.* 169: 726-736.
- Sreevidya V.S., Rao C.S., Sullia S.B., Ladha J.K., Reddy P.M.** (2006). Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *J. Exp. Bot.* 57: 1957-1969.
- 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.
- Tan Z.Y., Burek T., Vinuesa P., Muller P., Ladha J.K., Reinbold-Burek B.** (2001). Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3655-3664.
- Tanabe M., Kanehisa M.** (2012). Using the KEGG Database Resource. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 38: 1-43.
- Tanaka K., Cho S.-H., Lee H., Pham A.Q., Batek J.M., Cui S., Qiu J., Khan S.M., Joshi T., Zhang Z.J., Xu D., Stacey G.** (2015). Effect of lipo-chitooligosaccharide on early growth of C4 grass seedlings. *J. Exp. Bot.* 66: 5727-5738.
- Tarazona S., Furio-Tari P., Turra D., Pietro A.D., Nueda M.J., Conesa A., Ferrer A.** (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* 43, e140.
- Tirichine L., Imaizumi-Anraku H., Yoshida S., Murakami Y., Madsen L. H., Miwa H., Nakagawa T., Sandal N., Albrektsen A.S., Kawaguchi M., Downie A., Sato S., Tabata S., Kouchi H., Parniske**

- M., Kawasaki S., Stougaard J.** (2006). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441: 1153-1156.
- Tirichine L., Sandal N., Madsen L.H., Radutoiu S., Albrektsen A.S., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Stougaard J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315: 104-107.
- Toki S., Hara N., Ono K., Onodera H., Tagiri A., Oka S., Tanaka H.** (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* 47: 969-976.
- Toth K., Stratil T.F., Madsen E.B., Ye J., Popp C., Antolin-Llovera M., Grossmann C., Jensen O.N., Schussler A., Parniske M., Ott T.** (2012). Functional domain analysis of the remorin protein LjSYMREM1 in *Lotus japonicus*. *Plos One* 7, e30817.
- Vadassery J., Oelmüller R.** (2009). Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions: what can we learn from the interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 4: 1024-1027.
- Van Rhijn P., Goldberg R.B., Hirsch A.M.** (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of soybean lectin gene. *Plant Cell* 10: 1233-1249.
- Venkateshwaran M., Jayaraman D., Chabaud M., Genre A., Balloon A. J., Maeda J., Forshey K., den Os D., Kwiecien N.W., Coon J.J., Barker D.G., Ané J.M.** (2015). A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 9781-9786.
- Wang W., Xie Z.P., Staehelin C.** (2014). Functional analysis of chimeric lysin motif domain receptors mediating Nod factor-induced defense signaling in *Arabidopsis thaliana* and chitin-induced nodulation signaling in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 78: 56-69.
- Webster G., Gough C., Vasse J., Batchelor C.A., O'Callaghan K.J., Kothari S.L., Davey M.R., Dénarié J., Cocking E.C.** (1997). Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil* 194: 115-122.
- Yamauchi T., Tanaka A., Tsutsumi N., Inukai Y., Nakazono M.** (2020). A role for auxin in ethylene-dependent inducible aerenchyma formation in rice roots. *Plants* 9, 610.
- Yano K., Yoshida S., Muller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M.** (2008). CYCLOPS - a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 20540-20545.
- Yanni Y.G., Rizk R.Y., Corich V., Squartini A., Ninke K., Philip-Hollingsworth S., Orgambide G., de Bruijn F., Stoltzfus J., Buckley D., Schmidt T. M., Mateos P.F., Ladha J.K., Dazzo F.B.** (1997). Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194: 99-114.
- Yanni Y., Rizk R., Abd El-Fattah F., Squartini A., Corich V., Giacomini A., de Bruijn F., Rademaker J., Maya-Flores J., Ostrom P., Vega-Hernandez M., Hollingsworth R., Martinez-Molina E., Mateos P., Velazquez E., Wopereis J., Triplett E., Umali-Garcia M., Anarna J., Rolfe B., Ladha J., Hill J.,**

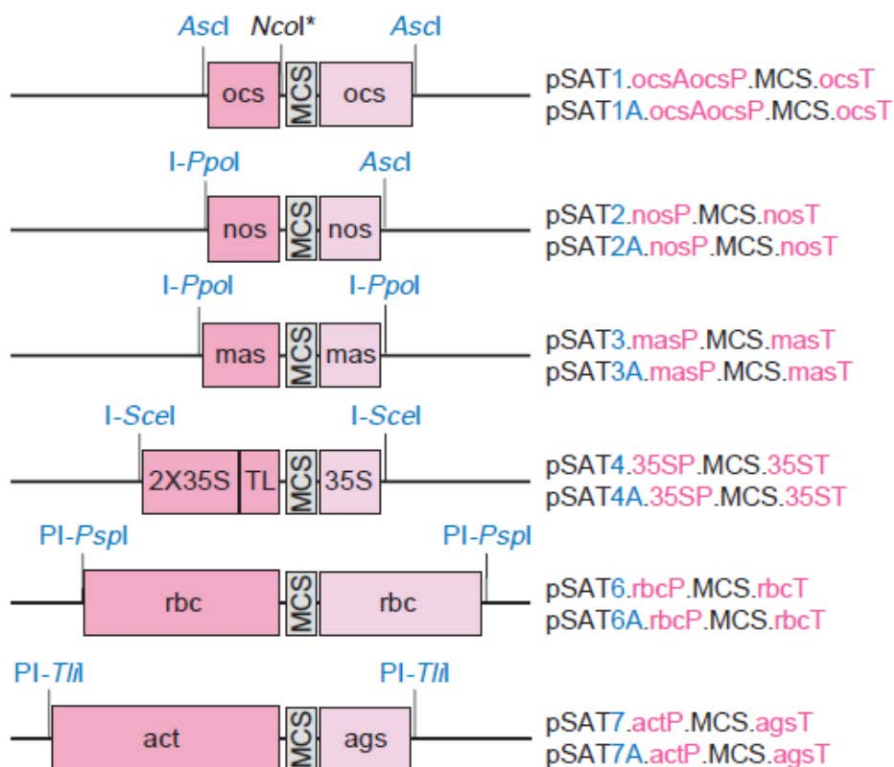
- Mujoo R., Ng P., Dazzo F.** (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 845-870.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 20540-20545.
- Yokota K., Soyano T., Kouchi H., Hayashi M.** (2010). Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis are retained in homologs of a nonlegume, rice. *Plant Cell Physiol.* 51: 1436-1442.
- Yoshida S., Forno D.A., Cock J.H., Gómez K.A.** (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Filipinas.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K.S., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiongh Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Yuan P., Jauregui E., Du L., Tanaka K., Poovaiah B.W.** (2017). Calcium signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions. *Curr. Op. Plant Biol.* 38, 173-183.
- Zhang X.C., Wu X., Findley S., Wan J., Libault M., Nguyen H.T., Cannon S.B., Stacey G.** (2007). Molecular evolution of LysM type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol.* 144: 623-636.
- Zhang X., Dong W., Sun J., Feng F., Deng Y., He Z., Oldroyd G.E.D., Wang E.** (2015). The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signaling. *Plant J.* 81: 258-267.
- Zhu H., Riely B.K., Burns N.J., Ané J.M.** (2006). Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Genetics* 172: 2491-2499.
- Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J.** (2008). The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1600-1608.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749-760.
- Zipfel C., Oldroyd G.E.D.** (2017). Plant signaling in symbiosis and immunity. *Nature* 543: 328-336.

Anexo I. Construcción de los vectores de transformación (RCS2) con los diferentes casetes de expresión.

vRCS2:

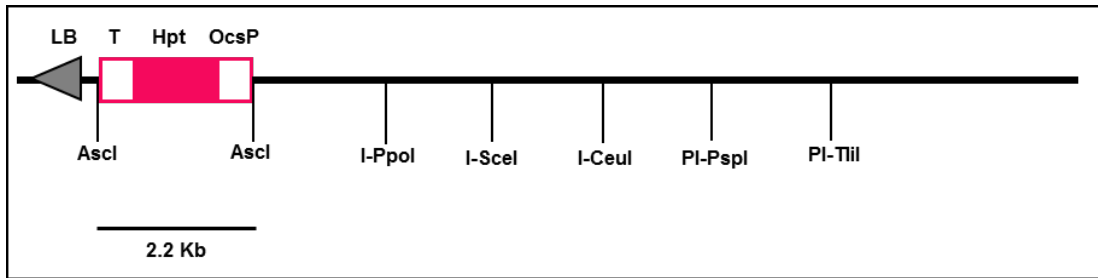


Vectores intermediarias usados para la construcción de los casetes génicos:

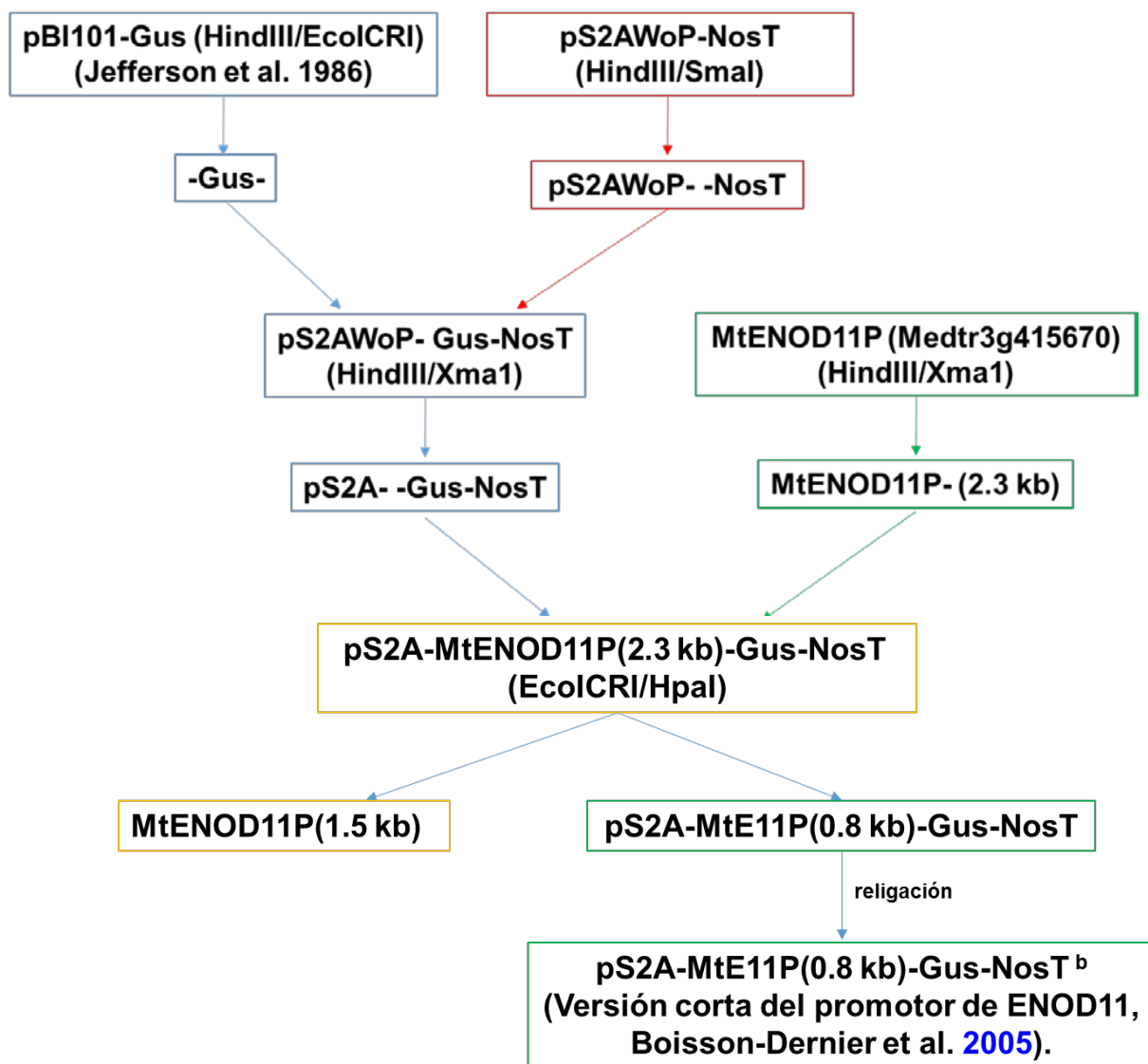


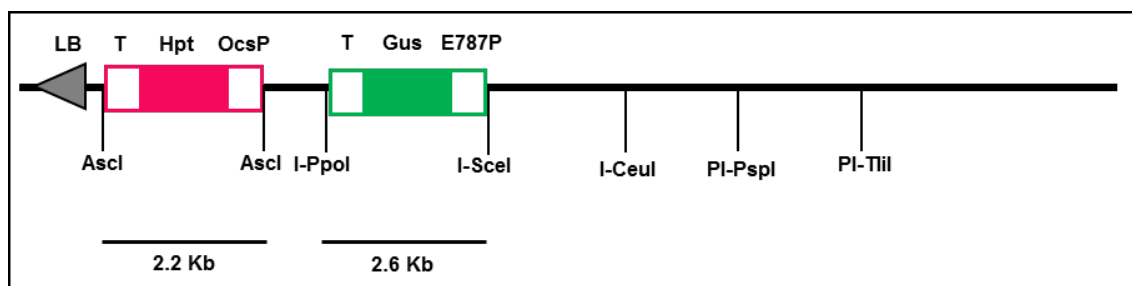
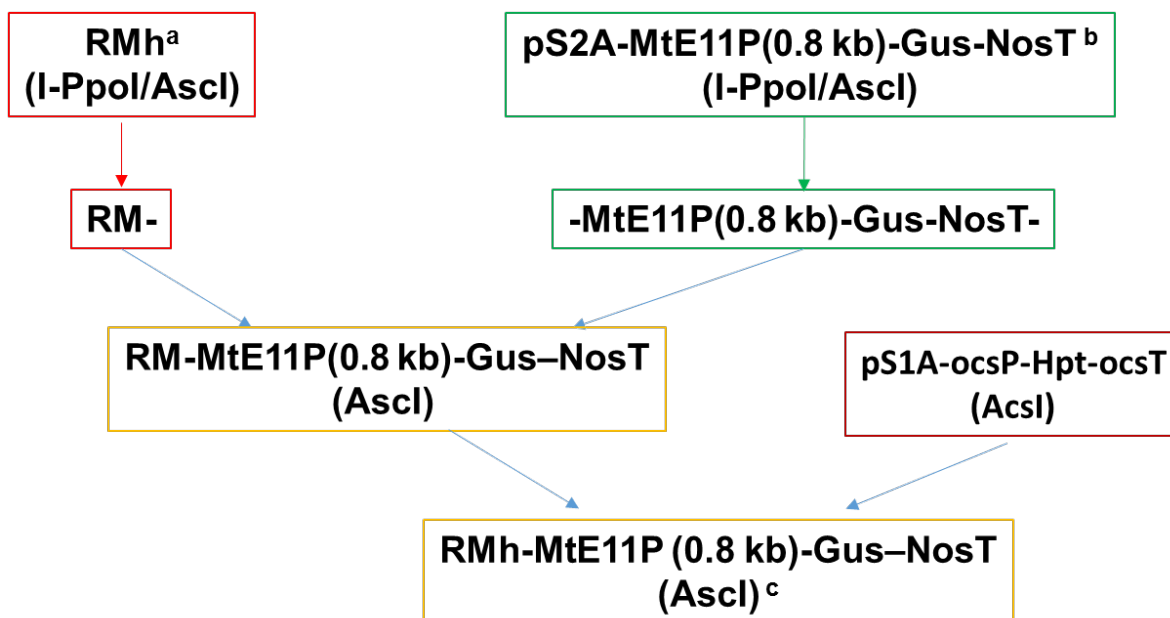
Imágenes tomadas de Chung et al. (2005)

1. RMh: vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT^a

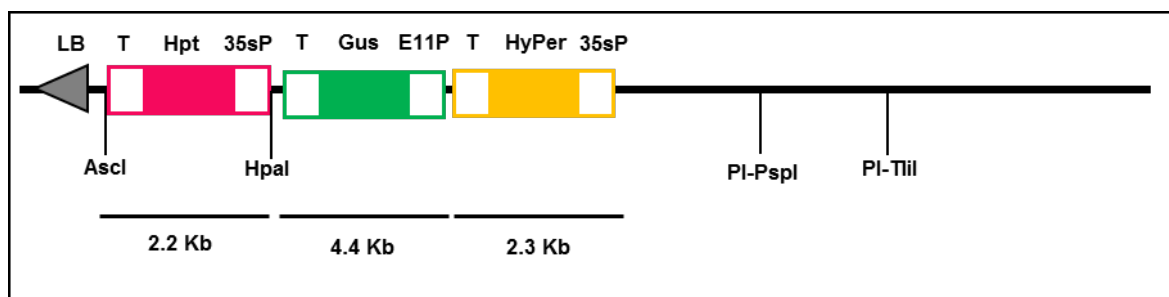
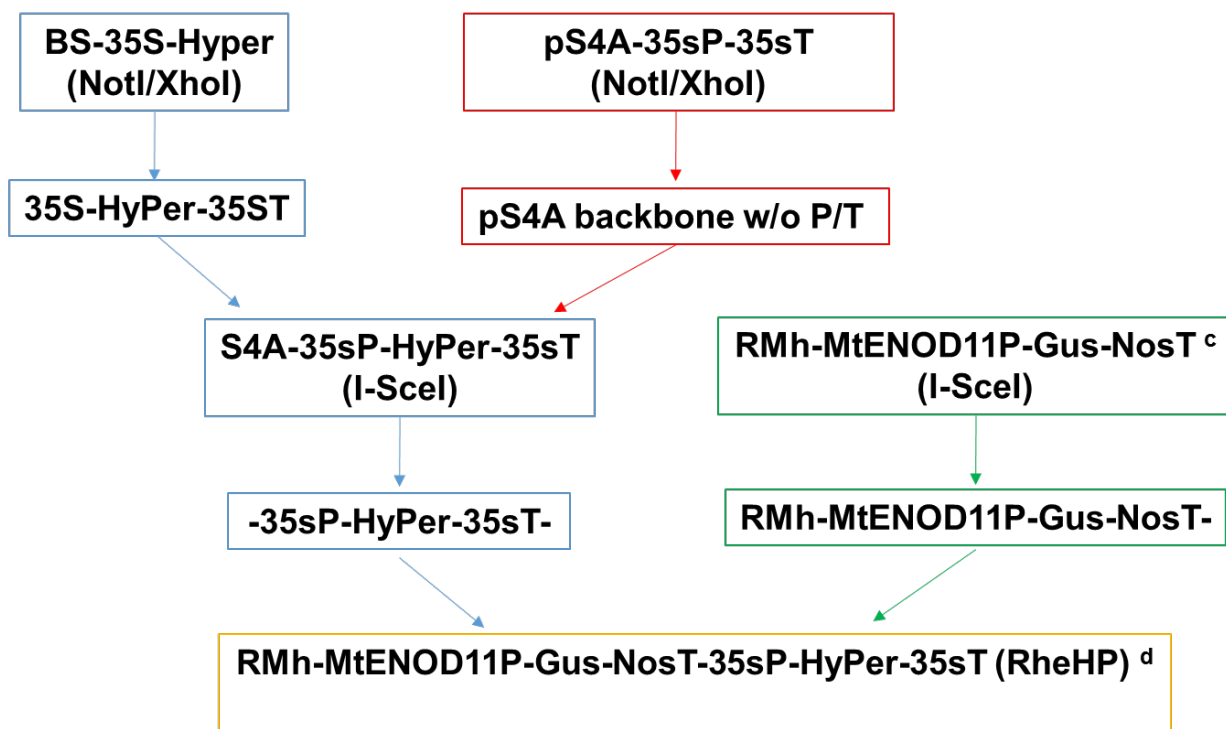


2. RMheG: *vRCS2* + *OcsP-Hpt-OcsT* + *MtENOD11P-GUS-NosT*

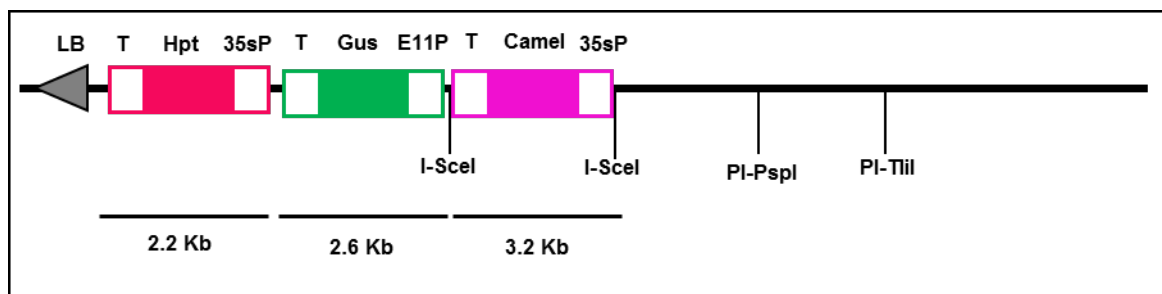
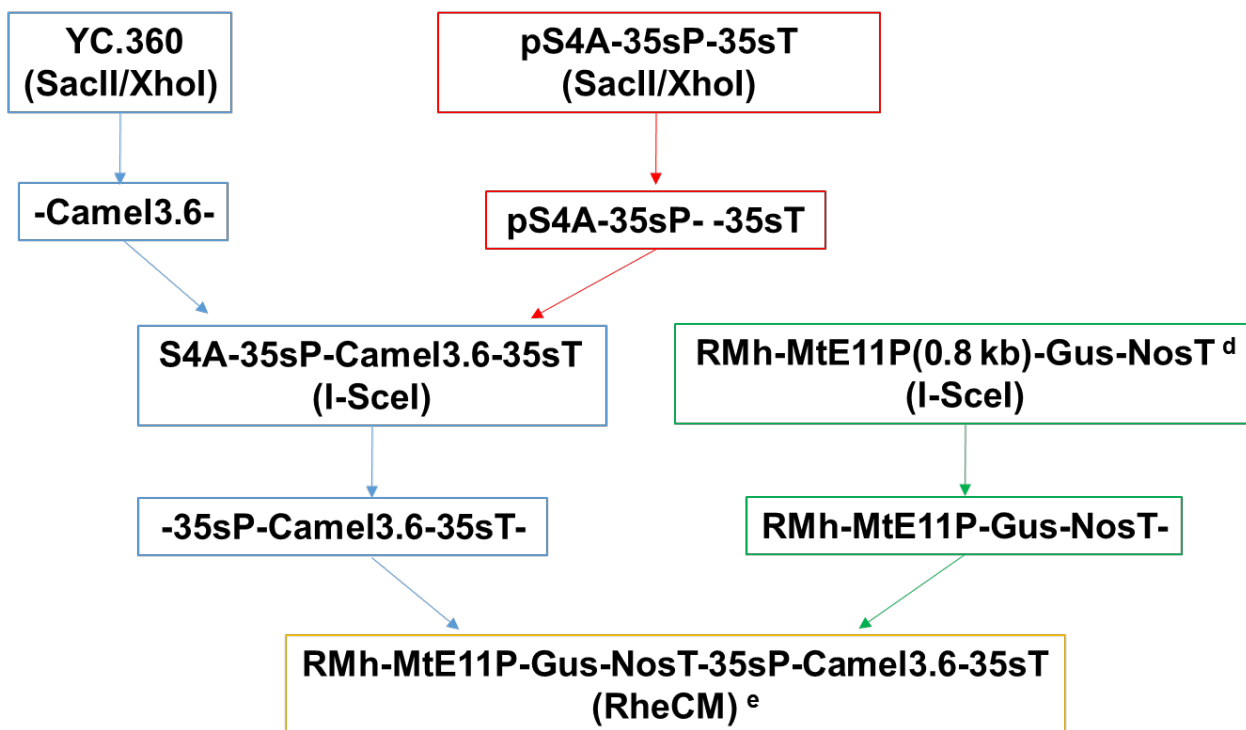




3. **RheHP: vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT + MtE11P-GUS-NosT + 35SP-HyPer-35sT**



4. **RheCM**: vRCS2 + 35sP-Hpt-NosT + MtE11P-GUS-NosT + 35SP-Camel3.6-35sT



- 5. PhL:** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1*

- 6. J5hL:** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1, AtActP-DMI2-NosT*

- 7. PhLeGHP:** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1, MtENOD11P-GUS-NosT, 35SP-HyPer-35ST*

- 8. PhLeGCM:** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1, MtENOD11P-GUS-NosT, 35SP-Cameleon3.6-35ST*

- 9. J5hLeGHP:** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1, AtActP-DMI2-NosT, MtENOD11P-GUS-NosT, 35SP-HyPer-35ST*

- 10. J5hLeGCM** *vRCS2 + OcsP-Hpt-OcsT, Rcg2P-LjLNP-Rcg2T, OsActP-LYK3-NosT, MasP-MtSYMREM-MasT, ZmUbiP-NFP-Tm1, AtActP-DMI2-NosT, MtENOD11P-GUS-NosT, 35SP-Cameleon*

Modificación de vectores intermediarios para permitir el ensamblado de los casetes de transformación.

Modificación de pUbi-MCS-Tm1:

Una porción del sitio de clonación múltiple (MCS: BamHI, XmaI y KpnI) del vector pUbi.tml, que contiene el promotor de ubiquitina de maíz, se reemplazó por el MCS que contiene los sitios de restricción de BamHI, SpeI, XmaI y KpnI (Wang y Waterhouse, 2000).

Modificación del vector pWAct1-MCS-nosT:

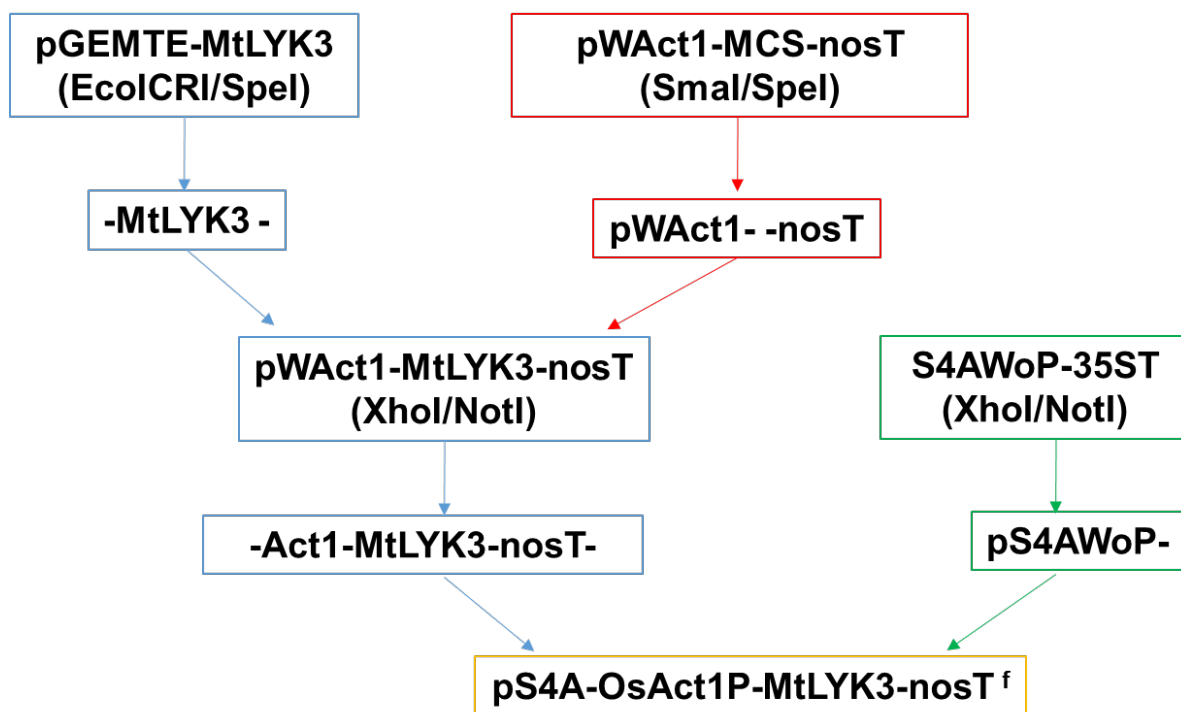
El promotor de actina de arroz, amplificado de pWAct-Gus (M-B. Wang, CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia, Schünmann et al., 2003) se digirió con XhoI/NotI y reclonó en el mismo vector pWAct.GUS vacío. El reemplazo de la secuencia original del promotor de actina en el vector se realizó para insertar un sitio de reconocimiento de Sall en el extremo 3' del promotor. Enseguida, la secuencia codificante de Gus se eliminó con Sall/KpnI y reemplazó por el MCS que contiene los sitios de restricción de Sall, XbaI, XmaI, SpeI y KpnI.

Desarrollo de los vectores intermediarios (sin promotores) pS3AWoP-masT, pS4AWoP-35ST y pS6AWoP-agsT:

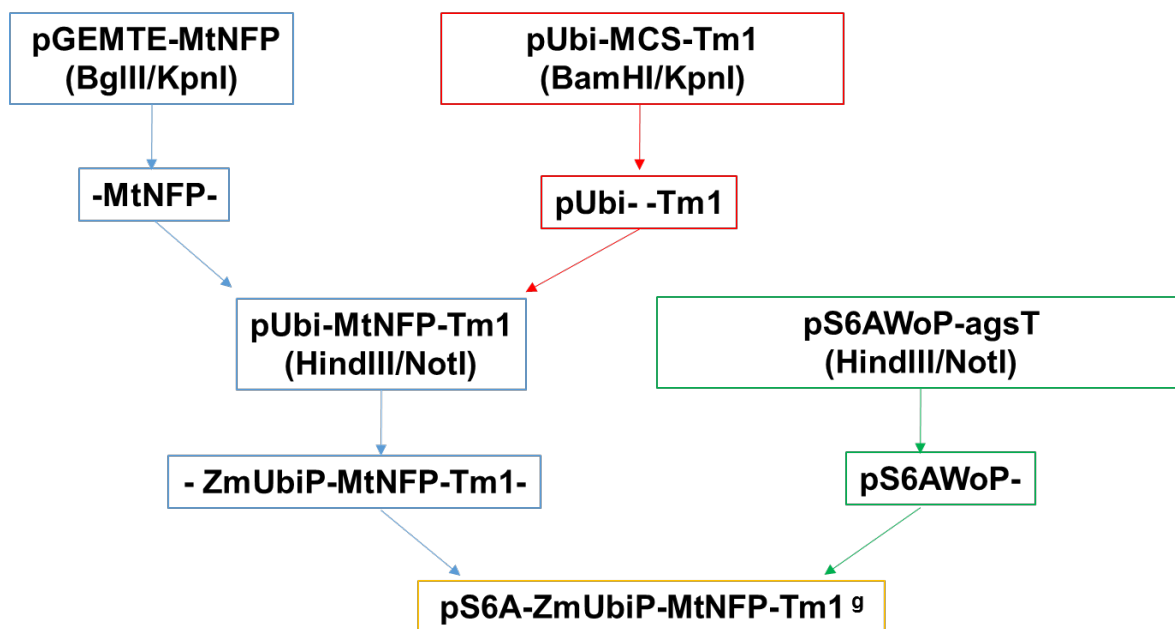
Los promotores de la manopina sintasa (MasP), 35SCaMV y RbcS presentes en los vectores pSAT3A, pSAT4A y pSAT6A (Chung et al., 2005), respectivamente, se eliminaron usando AgeI/BglII y reemplazaron con un adaptador sintético AgeI/BglII (Ver secuencias de los oligonucleótidos de genes, promotores y adaptadores en el cuadro 2).

Construcción de los casetes independientes con genes de leguminosas

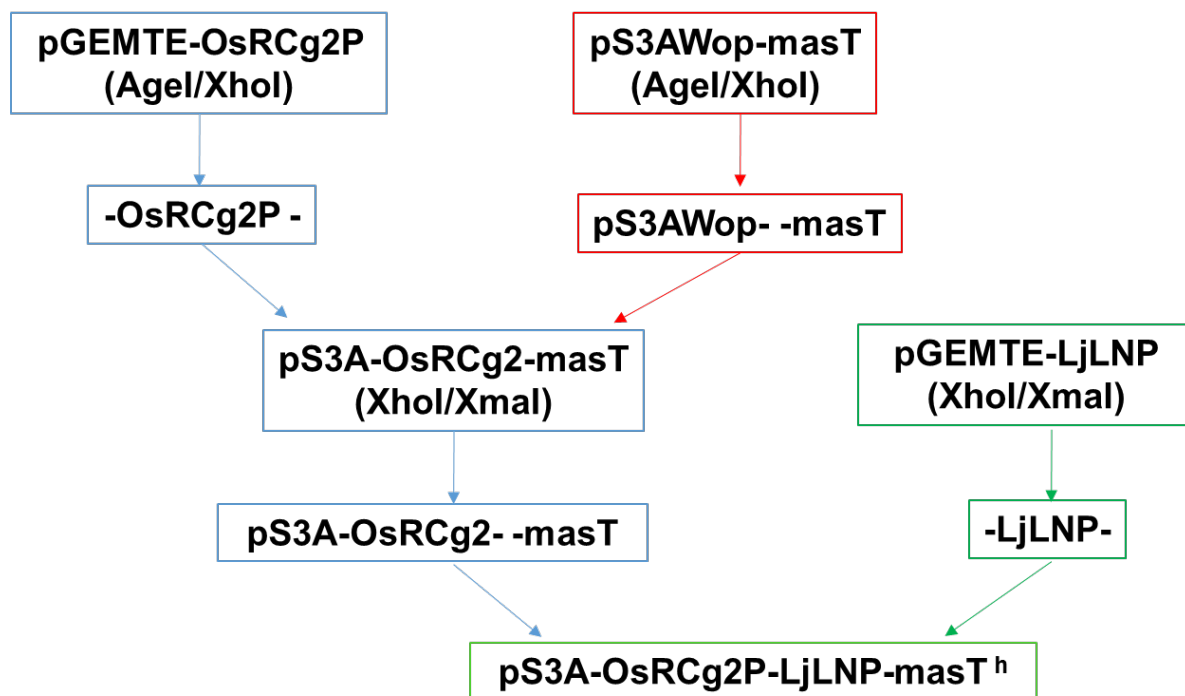
Construcción de pS4A-OsAct1P-MtLYK3-nosT



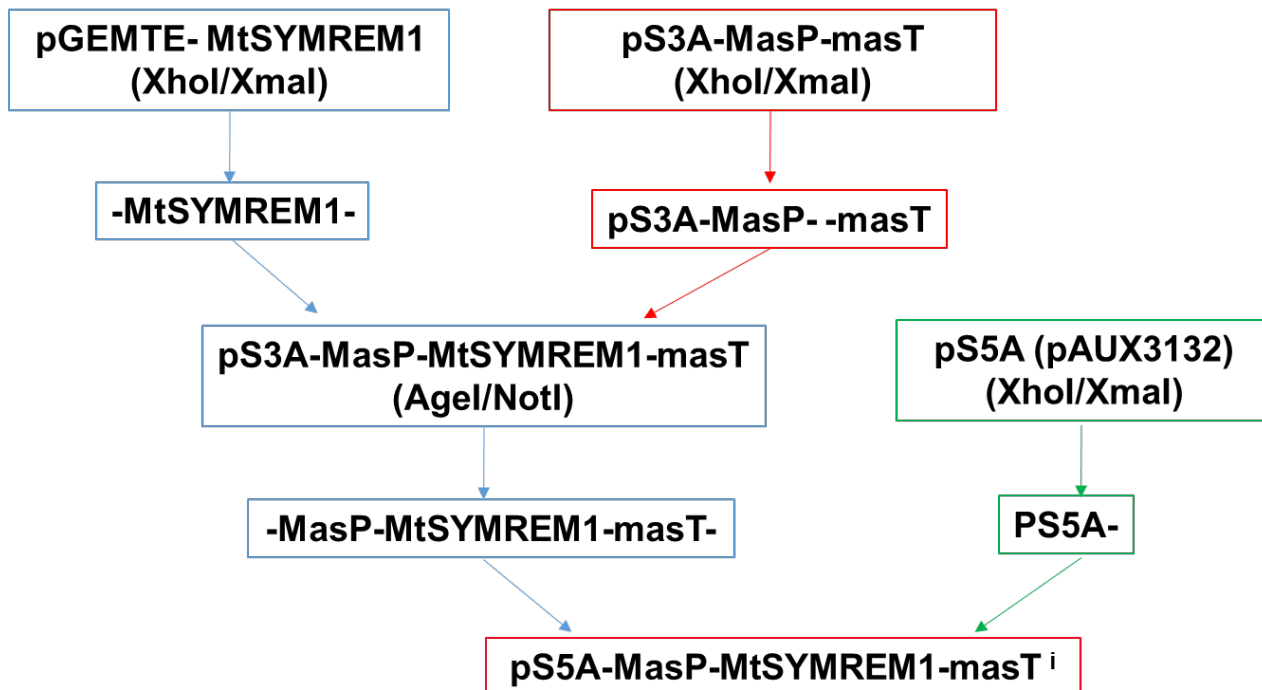
Construcción de pS6A-ZmUbiP-MtNFP-Tm1



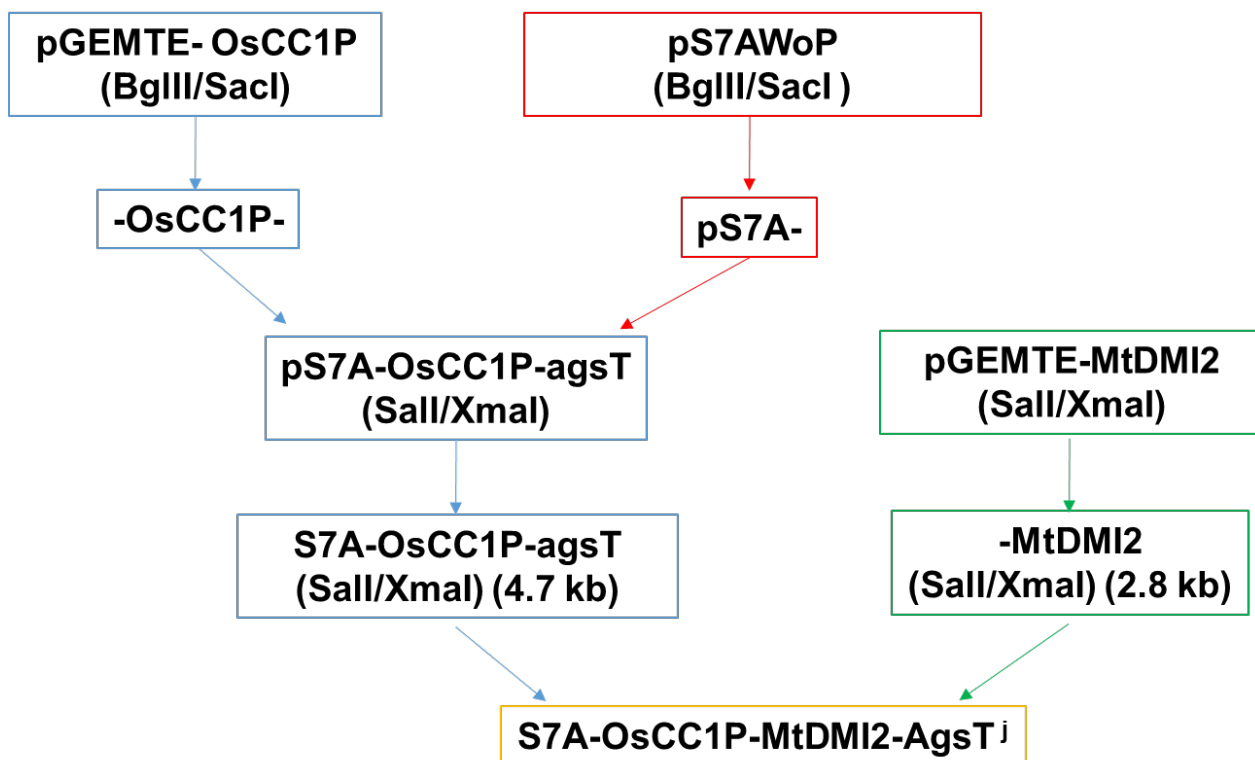
Construcción de pS3A-OsRCg2P-LjLNP-masT



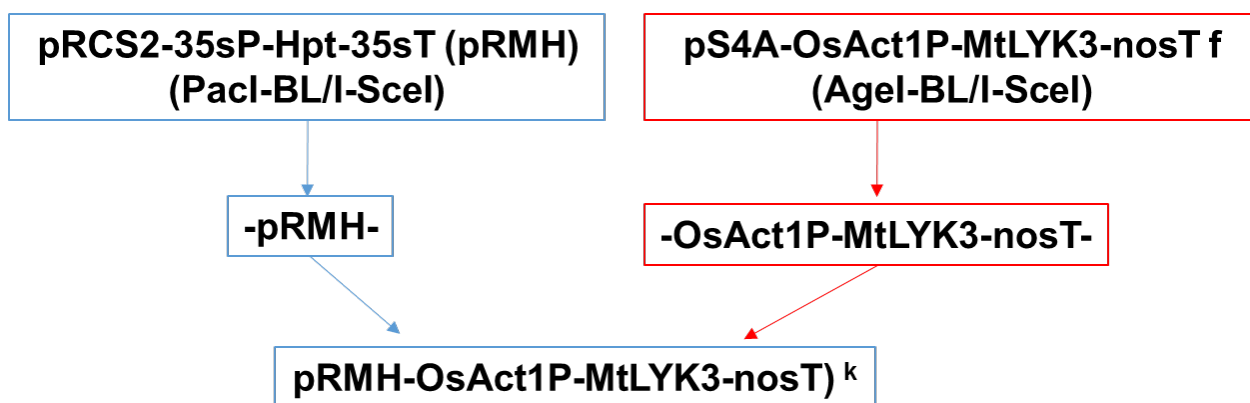
Construcción de pS5A-MasP-MtSYMREM1-masT



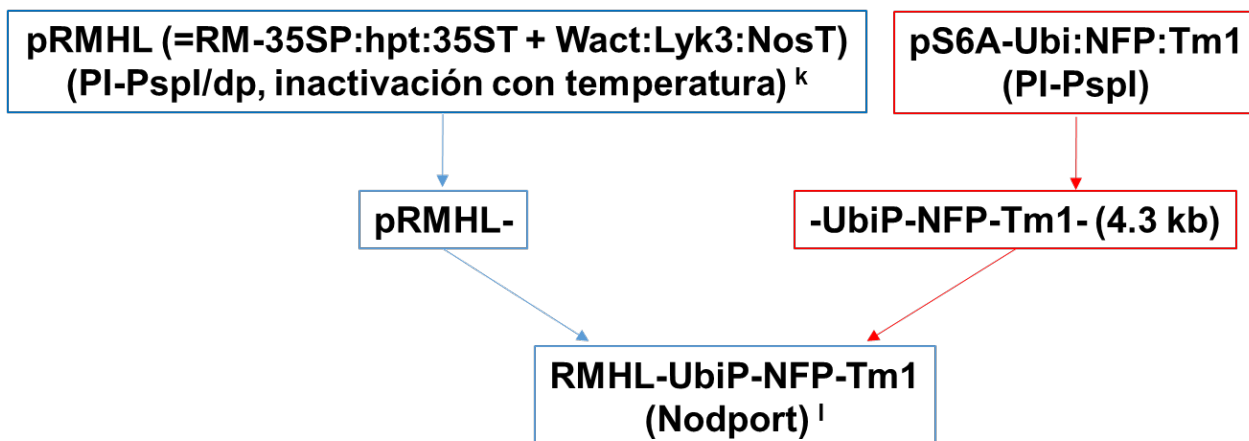
Construcción de pS7A-PrOsCC1-MtDMI2-agsT



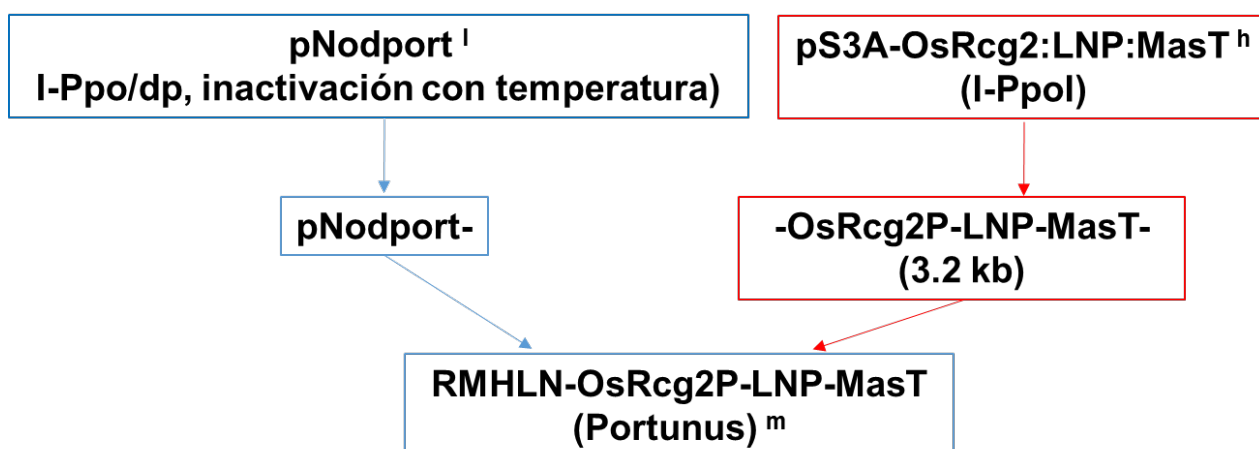
Construcción de pRMHL



Construcción de NodPort (=RM-35SP:hpt:35ST + Wact:Lyk3:NosT +
ZmUbi:NFP:Tm1)

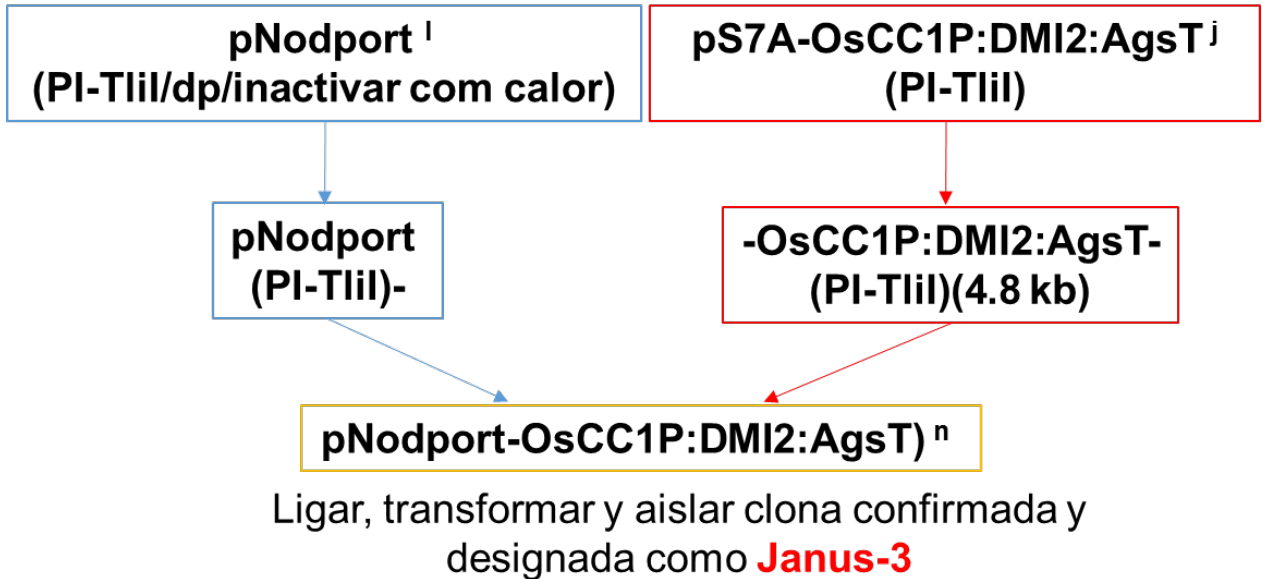


Construcción de Portunus (=RM-35SP:hpt:35ST + OsRcg2P:LNP:MasT +
Wact:Lyk3:NosT + ZmUbi:NFP:Tm1)

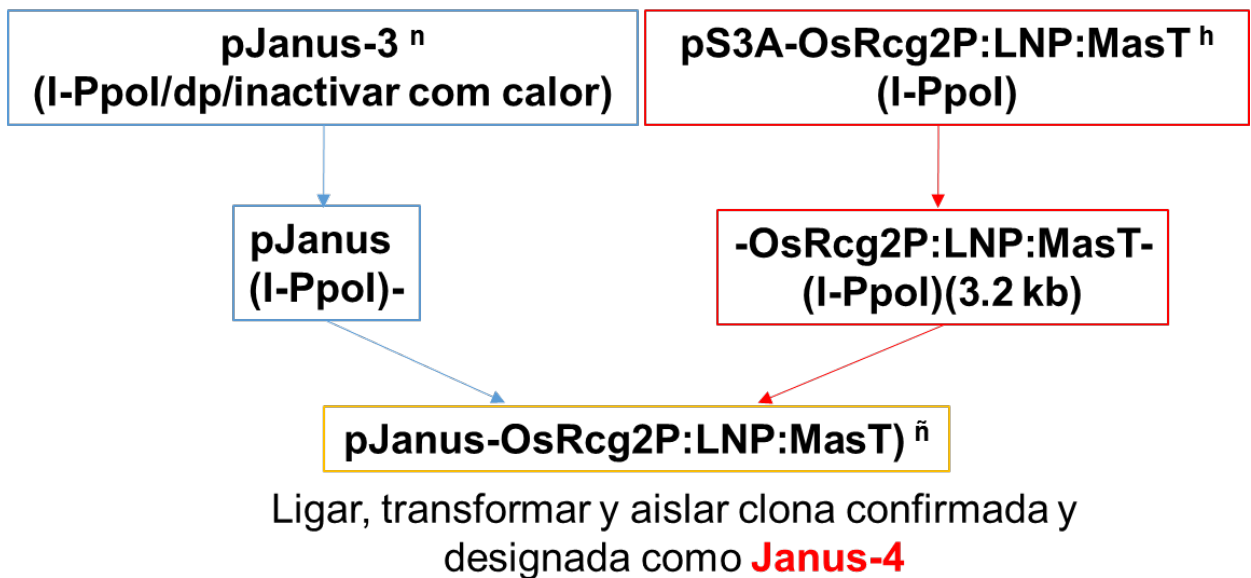


Ligar, transformar y aislar clona confirmada y designada como **Portunus**

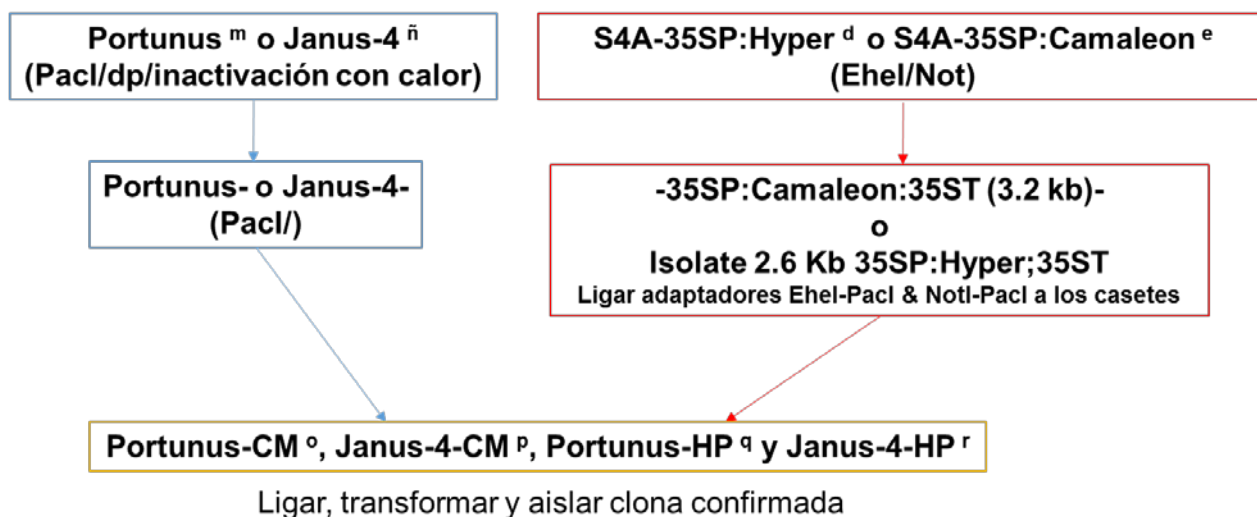
Construcción de Janus-3 (=RM-35SP:hpt:35ST + Wact:Lyk3:NosT +
ZmUbi:NFP:Tm1 + OsCC1P:DMI2:AgsT



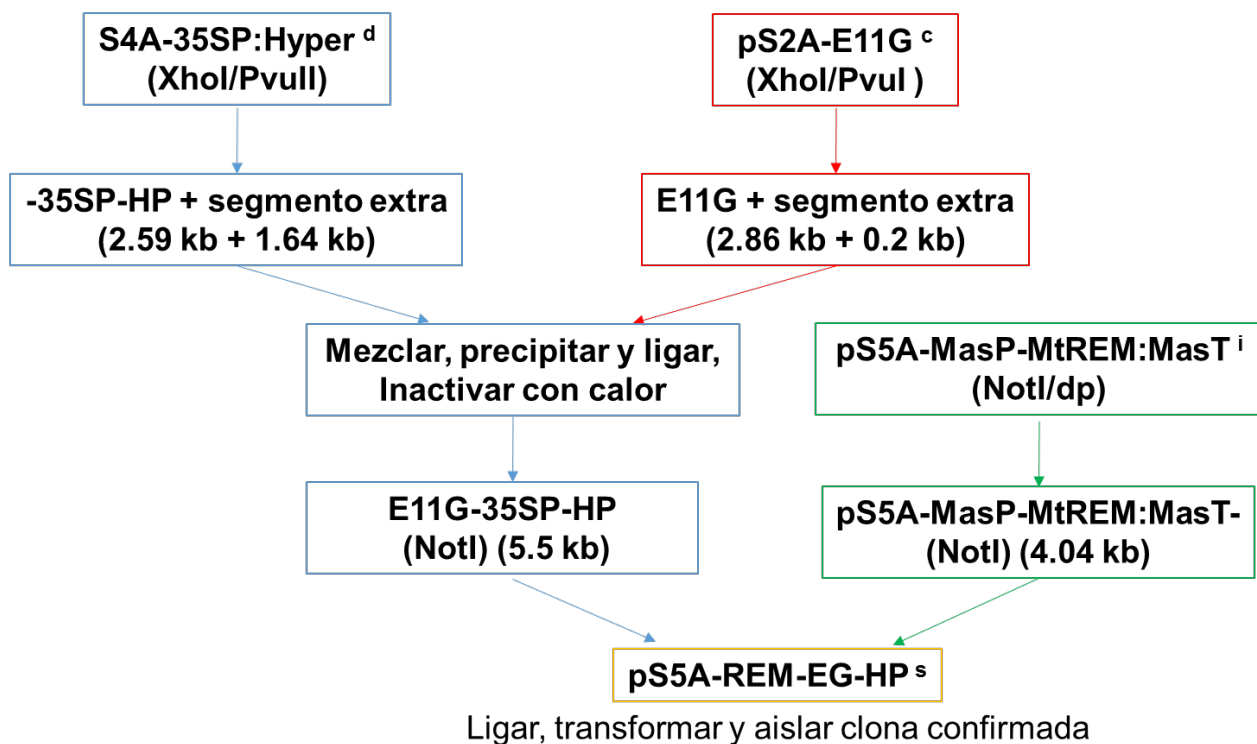
Construcción de Janus-4 (=RM-35SP:hpt:35ST + OsRcg2P:LNP:MasT +
Wact:Lyk3:NosT + ZmUbi:NFP:Tm1 + OsCC1P:DMI2:AgsT)



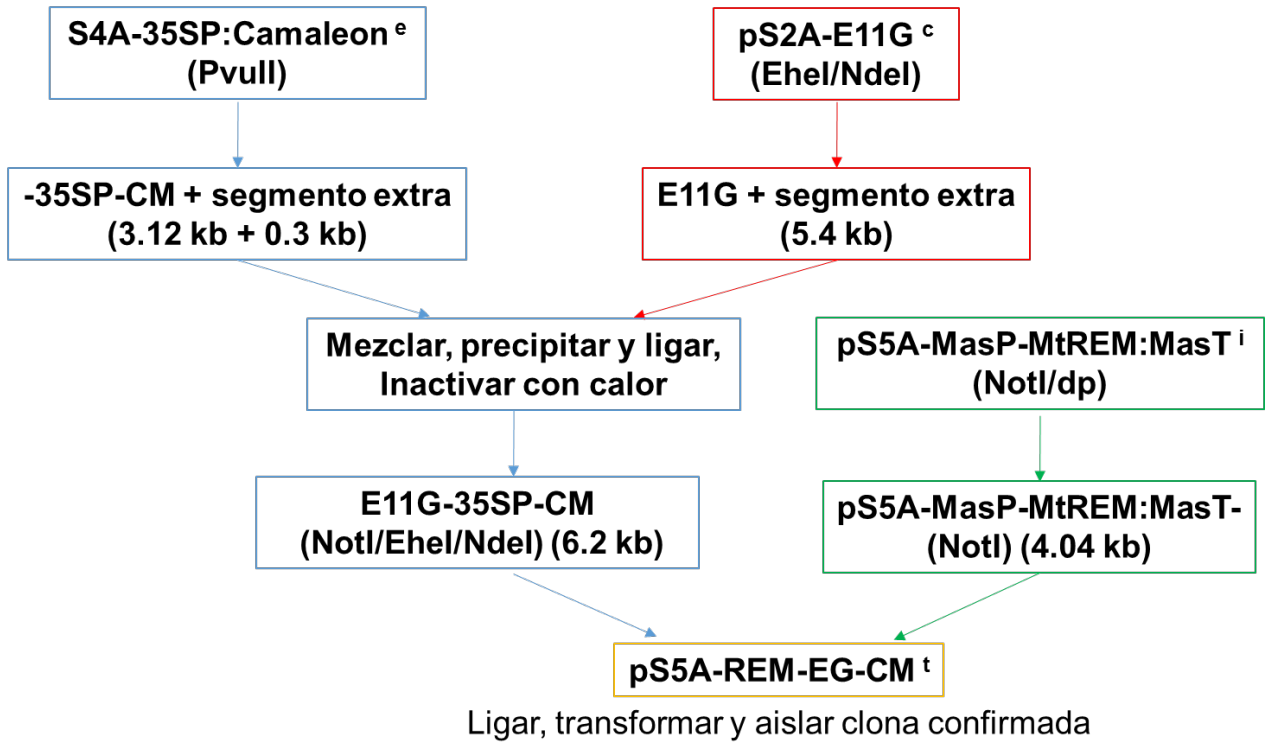
Construcción de Portunus-CM, Janus-4-CM, Portunus-HP y Janus-4-HP



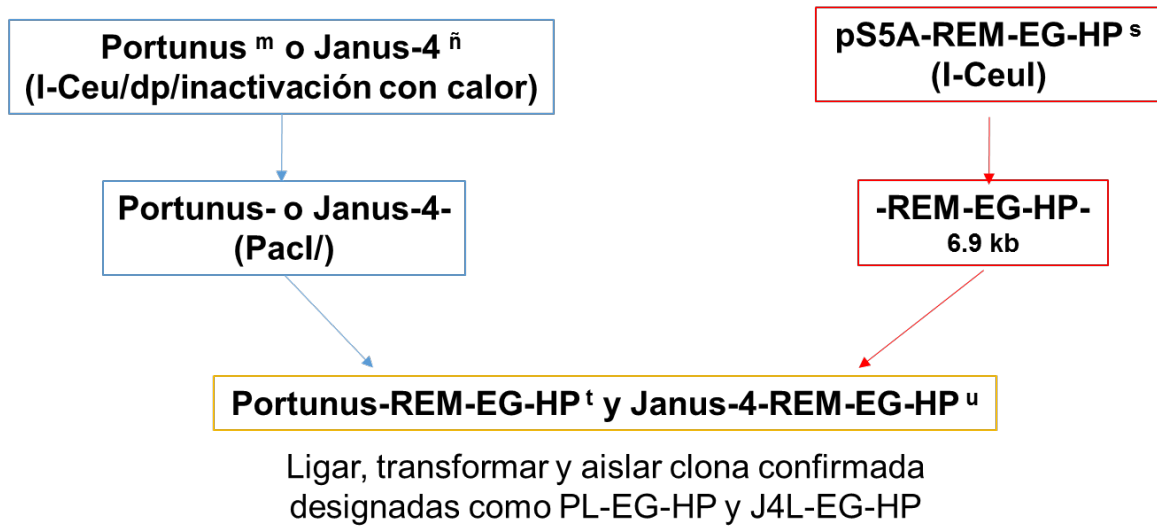
Construcción de pSAT5-REM-EG-HP



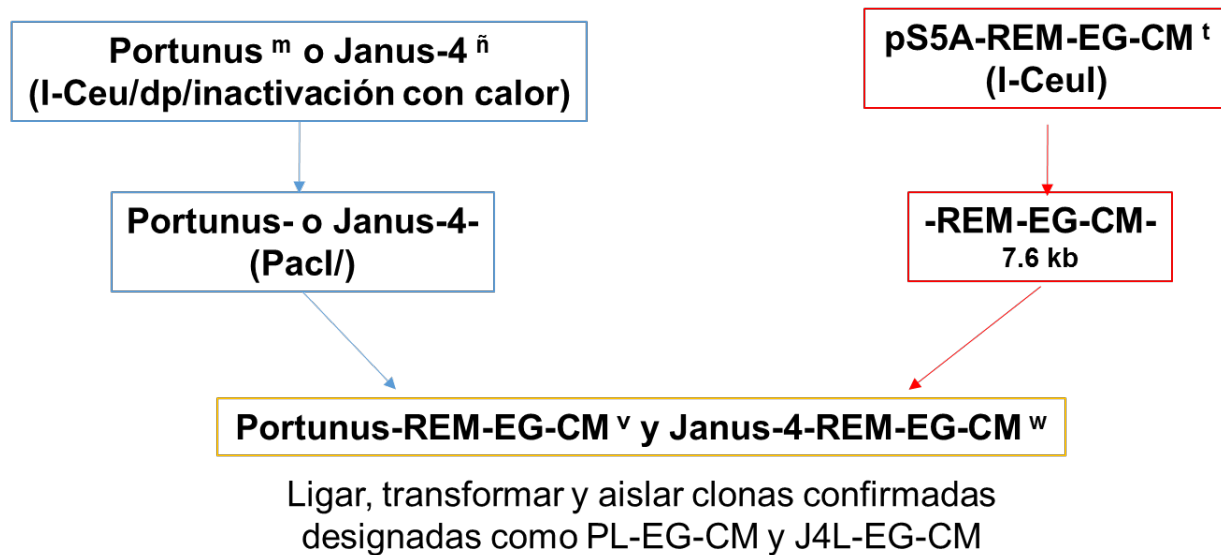
Construcción de pSAT5-REM-EG-CM



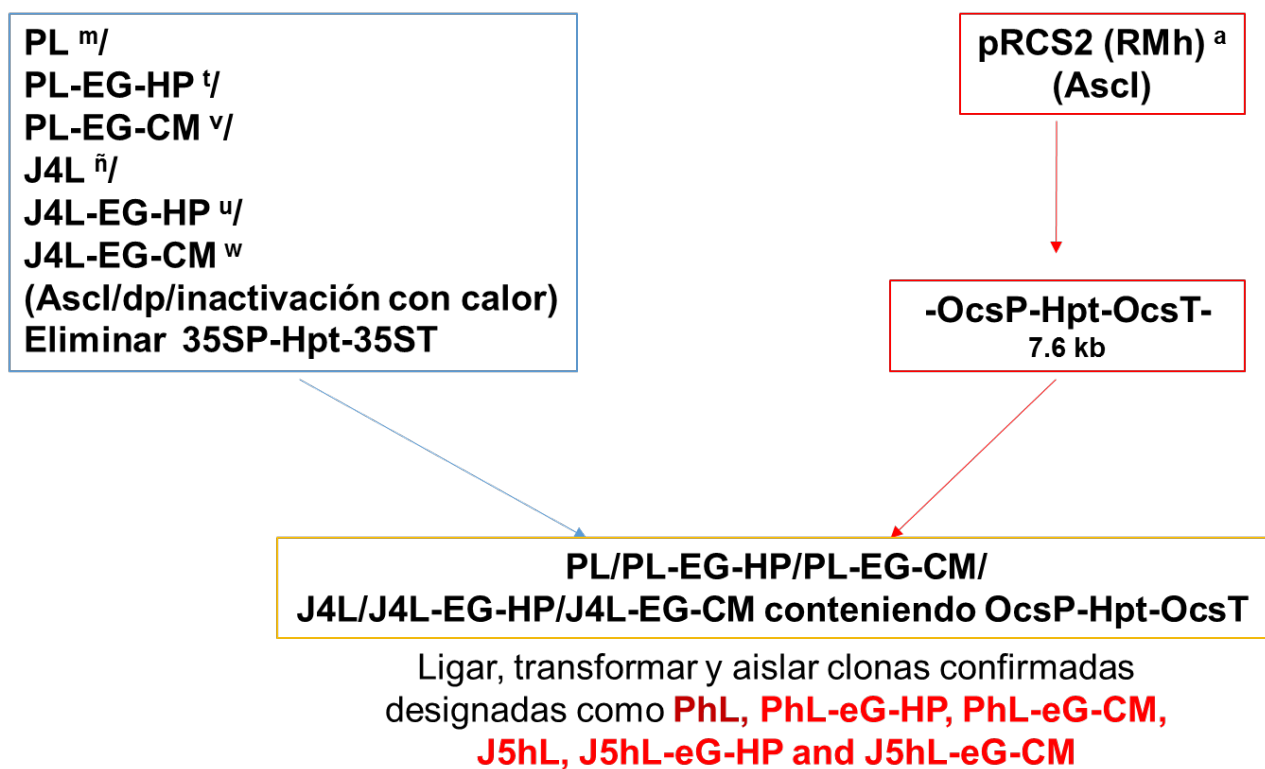
Construcción de PL-EG-HP y J4L-EG-HP



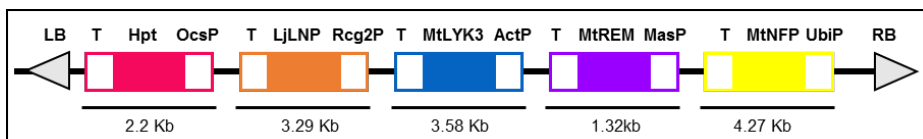
Construcción de PL-EG-CM y J4L-EG-CM



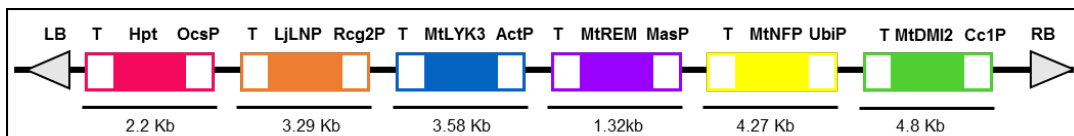
Construcción de PhL, PhL-EG-HP, PhL-EG-CM, J5hL, J5hL-EG-HP, y J5hL-EG-CM



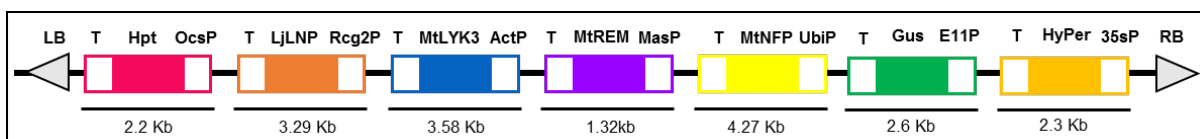
PhL



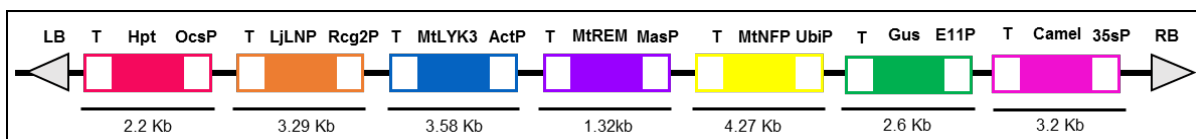
J5hL



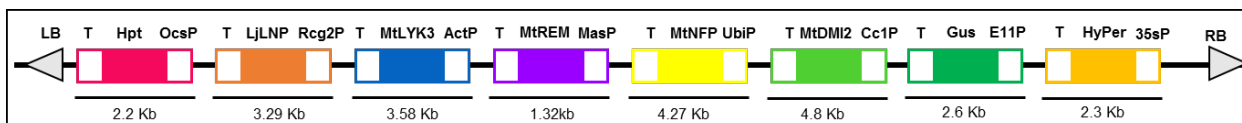
PhLeGHP



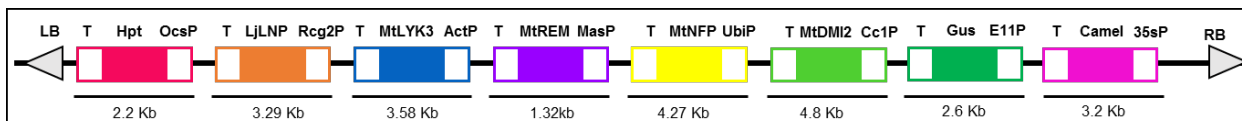
PhLeGCM



J5hLeGHP



J5hLeGCM



Bibliografía

- Boisson-Dernier A., Andriankaja A., Chabaud M., Niebel A., Journet E.P., Barker D.G., de Carvalho-Niebel F.** (2005). MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 1269-1276.
- Chung S.M., Frankman E.L., Tzfira T.** (2005). A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 357-361.
- Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D.** (1986). Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8447-8451.
- Schünmann P.H.D., Llewellyn D.J., Surin B., Boevink P., Feyter R.C.D., Waterhouse P.M.** (2003). A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. *Funct. Plant Biol.* 30: 443-452.
- Wang M.B., Waterhouse P.M.** (2000). High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is dependent of DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43: 67-82.

Anexo II. Artículo de divulgación

Altúzar-Molina A., Hernández G., Reddy P.M. (2018) Uso de la interacción entre los microorganismos del suelo y las plantas para mejorar la agricultura. *Hypatia* 60: 11-13.

Uso de la interacción entre los microorganismos del suelo y las plantas para mejorar la agricultura

M.C. Alma Rosa Altúzar Molina / aaltuzar1@hotmail.com

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Georgina Hernández Delgado / gina@ccg.unam.mx

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Pallavolu Maheswara Reddy / pallavolu.reddy@teri.res.in

The Energy and Resources Institute, IHC, Lodi Road, New Delhi 110003, India

La rizósfera, región circundante a las raíces de las plantas, es habitada por una gran cantidad de microorganismos muy diversos. El estudio de las interacciones, altamente dinámicas, entre los microorganismos presentes en la rizósfera y las raíces de las plantas, así como de su efecto sobre la planta y el suelo ha abierto una ventana de oportunidades en el mundo científico para su aprovechamiento en la agricultura.

El tipo de microorganismos presentes en la rizósfera de una planta incluyen bacterias, hongos, virus y algas; la naturaleza y abundancia de estos varía de acuerdo con el tipo y condición de la planta y con las condiciones ambientales. Entre las bacterias de la rizósfera más abundantes se incluyen, por ejemplo, Proteobacterias, Acidobacterias, Firmicutes, Actinobacterias y Bacteroidetes, las cuales pueden tener efectos benéficos para el desarrollo y el crecimiento de las plantas.

Comunicación planta-microorganismo.

Las raíces de las plantas secretan metabolitos (ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, compuestos fenólicos, enzimas, etc.) que influyen en la determinación del tipo de microorganismos presentes en la rizósfera, así como en su interacción con las plantas. Las características del exudado de una raíz son variables según la especie vegetal y las condiciones fisiológicas y ambientales en las que se encuentre la planta.

Los exudados de las raíces resultan atractivos a los microorganismos (algunos componentes del exudado les sirven como fuentes de carbono), por lo que la rizósfera, comparada con el suelo libre de raíces, se encuentra enriquecida con una diversidad de microorganismos que establecen interacciones que resultan en efectos positivos, negativos o neutros en las plantas. Además, existen componentes de los exudados que sirven de señales a microorganismos específicos para desencadenar procesos de reconocimiento bacteria-planta e iniciar la interacción. Algunos microorganismos rizosféricos se encuentran en estrecho contacto con las raíces de las plantas y otros denominados endófitos- pueden hospedarse dentro de las raíces, ya sea entre los espacios celulares o dentro de las células.

Ejemplos de interacciones benéficas entre plantas y microorganismos

Las interacciones benéficas o mutualistas entre las plantas y los microorganismos de la rizósfera, pueden contribuir con el crecimiento de la planta mediante la mineralización o descomposición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrimentos, el control de microorganismos nocivos o patógenos y la producción de sustancias promotoras del crecimiento o fitorreguladores. Ejemplos de interacciones benéficas entre plantas y microorganismos incluyen 1. La interacción entre plantas leguminosas -como el frijol, la soya, la alfalfa- con bacterias rizobiales (o rhizobia) que permite la fijación biológica del nitrógeno atmosférico para convertirlo a una forma asimilable para la planta (Figura 1). 2. La interacción entre las plantas con los hongos micorrícicos que favorece principalmente

el aprovechamiento del fósforo. Además, la interacción de ciertos microorganismos con las raíces de las plantas puede inhibir el crecimiento de poblaciones de microorganismos patógenos, mediante la competencia por el sitio o nicho ecológico que ocupan o mediante la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas y antifúngicas.

¿Cómo pueden aprovecharse en la agricultura las interacciones benéficas planta – microorganismo?

La población mundial exige cada vez más un incremento en la producción de alimentos, la cual es principalmente limitada por la disponibilidad de nutrimentos en el suelo. Con el paso de los años, el uso de fertilizantes químicos, que durante la “Revolución Verde” apuntaló la producción de alimentos, ha mostrado un umbral por lo que su incremento ya no se traduce en una mayor producción de alimentos, sino, por el contrario, la eficiencia de asimilación de los nutrimentos parece ir decreciendo. Además de que la aplicación excesiva de fertilizantes químicos resulta en la contaminación de ríos y lagos.

Una de las principales limitantes en la producción de alimentos es la disponibilidad de nitrógeno. Como se mencionó previamente, la fijación biológica de nitrógeno realizada por bacterias rizobiales en leguminosas (Figura 1) constituye uno de los mejores ejemplos de las interacciones benéficas planta-microorganismo. Así, en el caso de cultivos de leguminosas, importantes como alimento y forrajes, no es necesario agregar fertilizantes nitrogenados al suelo para satisfacer este requerimiento nutricional, ya que lo proveen las rhizobia a manera de “biofertilizante”. Sin embargo, los cereales de importancia económica como el maíz, arroz, trigo, sorgo y cebada no tienen la capacidad para interactuar simbióticamente con rhizobia y se requieren grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados para asegurar su adecuada producción.

Otras estrategias alternativas que se han seguido para proveer el nitrógeno requerido para la producción de cereales incluyen los cultivos mixtos o la rotación de cultivos de leguminosas y cereales (como frijol y maíz), el uso de abonos orgánicos basados en leguminosas o la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Además, es importante destacar que recientemente se investigan estrategias moleculares o biotecnológicas que permitan establecer la simbiosis fijadora de nitrógeno entre cereales y bacterias rizobiales.

Estudios en las vías de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno por rizobia (casi exclusiva para leguminosas) y de la simbiosis micorrícica (presente en la mayoría de las plantas, incluyendo cereales), han mostrado que existen genes comunes para el establecimiento de ambos tipos de simbiosis, pero que algunos de los genes esenciales para la fijación de nitrógeno están ausentes en los cereales. Por tanto, uno de los enfoques actuales de la investigación científica orientada a promover la simbiosis de los cereales con bacterias rizobiales fijadoras de nitrógeno, consiste en suplementar la vía de señalización común, existente en cereales, con genes adicionales que medien el reconocimiento y la interacción simbiótica con rizobia. Por ejemplo, los genes provenientes de leguminosas que participan en el reconocimiento de factores Nod y algunos factores transcripcionales están siendo expresados en plantas de arroz y se analiza cuál es el impacto de la expresión de estos genes en promover su interacción con las bacterias rizobiales. Aunque los avances en este proyecto aún son limitados, constituyen un trabajo pionero que sentaría las bases para el establecimiento de la fijación biológica de nitrógeno en cereales.

El aprovechamiento de las interacciones benéficas entre las plantas y los microorganismos para mejorar la agricultura es de particular importancia en el mundo científico. Esto representa una alternativa viable para incrementar la producción de alimentos con un menor costo de producción, además de ser amigable con el ambiente evitando el uso excesivo de fertilizantes químicos.

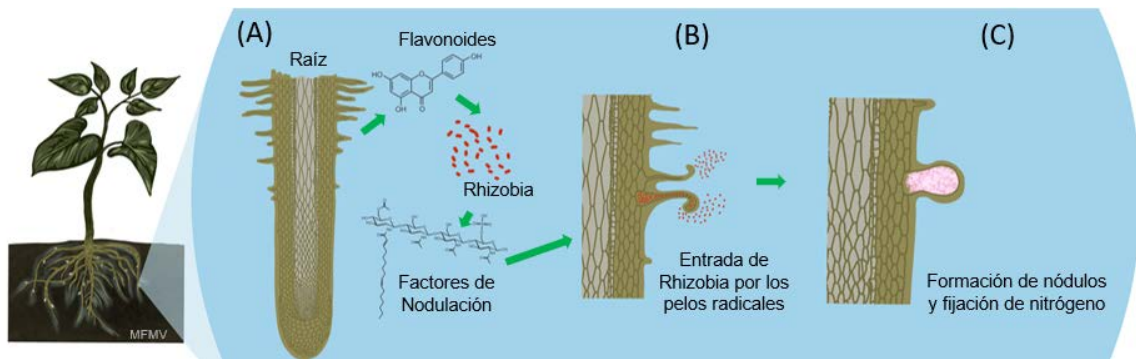


Figura 1. Interacción de las plantas leguminosas con bacterias rizobiales fijadoras de nitrógeno presentes en la rizósfera. A) La interacción inicia con la secreción de flavonoides por la raíz de la leguminosa; estos compuestos son reconocidos y percibidos por los rhizobia que inician la producción de factores de nodulación. A su vez, los factores de nodulación son reconocidos por receptores específicos presentes en la membrana de los pelos radicales. B) Con la percepción de los factores de nodulación se activa una vía de señalización que permite la deformación y enrollamiento del pelo radical y la entrada de la bacteria a través del llamado “hilo de infección”, que semeja un tunel que se dirige hacia la corteza de la raíz. C) Se desencadena la formación del nódulo en la corteza de la raíz. Este nuevo órgano aloja a los rhizobia y crea un ambiente idóneo para que las bacterias inicien la fijación biológica de nitrógeno atmosférico y proveer este nutrimento a la planta.

Anexo III. Artículo Científico

Altúzar-Molina A., Lozano L., Ortíz-Berrocal M., Ramírez M., Martínez L., Velázquez-Hernández M.L., Dhar-Ray S., Silvente S., Mariano N., Shishkova S., Hernández G., Reddy P.M. (2020). Expression of the legume-specific Nod factor receptor proteins alters developmental and immune responses in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 38: 262-281. La publicación final está disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11105-019-01188-9>

*Expression of the Legume-Specific
Nod Factor Receptor Proteins Alters
Developmental and Immune Responses in
Rice*

**Alma Altúzar-Molina, Luis Lozano,
Marlene Ortíz-Berrocal, Mario Ramírez,
Lourdes Martínez, María de Lourdes
Velázquez-Hernández, et al.**

Plant Molecular Biology Reporter

ISSN 0735-9640

Volume 38

Number 2


Plant Mol Biol Rep (2020) 38:262-281

DOI 10.1007/s11105-019-01188-9

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Expression of the Legume-Specific Nod Factor Receptor Proteins Alters Developmental and Immune Responses in Rice

Alma Altúzar-Molina^{1,2} · Luis Lozano¹ · Marlene Ortíz-Berrocal¹ · Mario Ramírez¹ · Lourdes Martínez¹ · María de Lourdes Velázquez-Hernández^{1,3} · Swatishmita Dhar-Ray⁴ · Sonia Silvente^{1,5} · Néstor Mariano⁵ · Svetlana Shishkova⁶ · Georgina Hernández¹ · Pallavolu M. Reddy^{1,4} 

Published online: 24 January 2020

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Legumes form symbiosis with rhizobia, which fix nitrogen for the benefit of host plant in return for carbon resources. Development of this unique symbiosis in legumes is triggered by rhizobia-secreted nodulation (Nod) factors (NFs). NFs, upon perception, activate Nod signaling cascade, leading to reprogramming of host cell (root) developmental networks to pave way for accommodating rhizobial symbionts. A long-cherished goal of legume-rhizobia symbiosis research is to extend this symbiotic nitrogen-fixing capacity to cereal plants such as rice. As a part of achieving this ultimate goal, in this work, initially we expressed legume-specific Nod factor receptor protein (NFRP) genes, *MtNFP*, *MtLYK3*, and *LjLNP*, in rice and assessed their impact on NF perception and consequently triggered biological responses in roots. RNA-seq analysis revealed that roots of both control and NFRP-expressing plants perceive NFs, but NFs elicited contrasting impacts on gene expression patterns in roots of these plants. In contrast to suppressive role of NFs on expression of several genes involved in innate immune response in roots of control plants, in NFRP-expressing plants, NFs triggered massive upregulation of a vast array of genes associated with signaling, defense response, and secondary metabolism networks in roots. Expression of NFRPs in rice also conferred root hairs the ability to respond to NFs in terms of exhibiting deformations, albeit at low levels. Together, results of the study demonstrated that rice plants have inherent ability to perceive NFs, but the expression of legume NFRPs rendered rice roots hypersensitive to NFs.

Keywords *Oryza sativa* · Legume Nod factor receptor proteins · Rice transformation · Nod factor perception · Symbiosis · Transcriptome

Key Message

• Extensive dissimilarities in gene expression patterns in control and NFRP-expressing rice plants in response to NFs suggest that the “putative NF receptors” of rice and the “NF receptors” of legumes transmit Nod signal differently, activating distinct signaling pathways to elicit disparate gene expression cascades in rice roots.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11105-019-01188-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pallavolu M. Reddy
pallavolu.reddy@teri.res.in; pmreddy2006@yahoo.com.mx

¹ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Present address: Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, Clúster Científico y Tecnológico Biomimic(R), Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, 91073 Xalapa, Veracruz, Mexico

³ Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, Los Reyes de Salgado, Michoacán, Mexico

⁴ The Energy and Resources Institute, India Habitat Centre, Lodi Road, New Delhi 110003, India

⁵ Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito, F5360CKB Chilecito, La Rioja, Argentina

⁶ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most widely cultivated cereals in the world in a range of climatic zones, and it is a staple food for nearly 50% of the human population. Nitrogen (N) is an essential nutrient for rice production and plays a crucial role in sustaining high yields. At current levels of N use efficiency, it is estimated that about 70% more N fertilizer will be required to increase rice production by 2050 to meet the food demands of growing human population (Africare and Oxfam 2010). Considering the existing practice, it is normal to envision that the increase in need for N to ensure crop production will be supplied by industrially produced synthetic N fertilizer. Excessive use of synthetic fertilizers not only entails high economic costs but also contributes to environmental degradation including climate change. To avoid these problems, an apt option to provide the N fertilizer requirement is via biological nitrogen fixation (BNF) (Ladha and Reddy 1995; Beatty and Good 2011). Thus, it is envisioned to construct a BNF system, such as the one similar to rhizobial symbiosis with legumes or through direct *nif* (nitrogen fixation) gene transfer, in rice plant itself to substantially minimize our dependence on fertilizer-N.

Legume plants form a symbiotic relationship with rhizobia, which fix atmospheric nitrogen and supply it to the host plant thereby effectively freeing the host legume from dependency on exogenous N supplies (Oldroyd 2013). Legumes, besides forming N₂-fixing root nodule symbiosis (RNS) with rhizobia, are also able to develop symbiotic associations with mycorrhizal fungi to form arbuscular mycorrhizae (AMS) to facilitate phosphate acquisition (Markmann and Parniske 2009). During the formation of rhizobial symbiosis, flavonoids secreted by legume roots activate production of rhizobial lipo-chitoooligosaccharide (LCO) molecules known as Nod factors (NFs), which upon perceived by the root cell plasma membrane-anchored NF receptor kinases (MtLYK3/LjNFR1 and MtNFP/LjNFR5 in the model legumes *Medicago truncatula* or *Lotus japonicus*, respectively) trigger signaling cascade to initiate the plant processes necessary for the development of RNS (Oldroyd 2013). In *Lotus japonicus*, another unique receptor protein known as lectin nucleotide phosphohydrolase (LjLNP) has also been shown to participate in NF perception (Roberts et al. 1999). In legumes, acting downstream of the NF receptors are a conserved set of gene products that participate in the development of both RNS and the more widespread and ancient AMS (Oldroyd and Downie 2008; Markmann and Parniske 2009). Thus, the signaling pathway mediated by these genes that promote both RNS and AMS is termed as “common symbiosis pathway” (CSP) (Markmann and Parniske 2009). Although rice cannot develop symbiotic association with rhizobia, it can interact symbiotically with mycorrhizal fungi to form AMS (Gutjahr et al. 2008). It has been shown that CSP that mediate AMS formation in legumes is also conserved in rice and plays a similar role in promoting AMS development in rice roots (Banba et al. 2008; Chen et al. 2007, 2008, 2009;

Gutjahr et al. 2008; Yano et al. 2008). Therefore, these findings imply that a part of the signal transduction pathway needed for RNS is conserved in rice, and this genetic network can form building blocks to add on additional genetic circuits needed for the development of rhizobial symbiosis in rice. At present, there is enhanced interest in ascertaining whether rhizobia would be able to form symbiosis with monocot like rice and carry out N₂ fixation (Reddy et al. 2013; Rogers and Oldroyd 2014).

In rice, homologues of the legume NF receptor kinases have been identified (i.e., OsCERK1 and OsNFR5, the rice homologues of the *Medicago truncatula* LYK3 and NFP, respectively) (Miyata et al. 2014, 2016; Zhang et al. 2015). Nevertheless, their extracellular domains (ECDs) are poorly conserved in comparison with the ECD regions that recognize NFs in the legume NF receptor kinases (the ECD of OsCERK1 is only 40% identical to the ECD of MtLYK3 at amino acid level, while the ECD of OsNFR5 exhibited 47% identity to the ECD of MtNFP), even though kinase domains (KDs) are reasonably well preserved (the KD of OsCERK1 is 74% identical to the KD of MtLYK3, while the KD of OsNFR5 exhibited 45% identity to the KD of MtNFP). Similarly, homologue of LjLNP, another NF binding receptor protein (a member of a distinct class of apyrases from legumes; Roberts et al. 1999) is also poorly conserved in rice. The closest homologue of the *Lotus japonicus* LNP in rice is an apyrase (AK066262), which showed only 48% identity at amino acid level with LjLNP; particularly, it is very lowly conserved at the N-terminal region. The absence of suitable NF receptors that are able to perceive and transmit rhizobial Nod signals may be one reason for the inability of rice roots to interact symbiotically with rhizobia. Thus, we hypothesized that if proper Nod factor receptor proteins (NFRPs) are expressed in rice plant, then, the roots may be able to perceive and transmit Nod signal appropriately to the downstream components of CSP to trigger symbiotic responses.

Hence, in this work, we have expressed in rice plants the legume NF receptor genes involved in perception and early Nod signal transduction, and assessed their ability in promoting symbiotic reactions and transcriptional changes in transgenic rice roots in response to NFs. Incorporation of genes involved in the perception of nodulation signals allows us to expand our knowledge on the ability of rice to interact symbiotically with rhizobia and establish the groundwork for assembling symbiotic nitrogen fixation in rice.

Materials and Methods

Construction of Plant Transformation Vector Carrying Multi-gene Expression Cassettes

The coding sequences of *MtNFP* (DQ496250.1) (Arrighi et al. 2006), *MtLYK3* (AY372406.1) (Limpens et al. 2003),

MtSYMREM1 (JQ061257.1) (Lefebvre et al. 2010), and *LjLNP* (AF156780.1) (Roberts et al. 1999) were amplified by RT-PCR using gene-specific primers (Supplementary Table S1) based on the mRNA sequences available in databases and cDNA prepared from total RNA derived from the roots of *Medicago truncatula* A17 or *Lotus japonicus* MG-20. *MtNFP* was amplified using the forward 5'-AGATCTATGTCTGCCTTCTTCTTCCTTCTAG-3' and reverse 5'-GGTACCTTAACGAGCTATTACAGAAGTAACAAC-3', *MtLYK3* with the forward 5'-GAGCTCATGAATCTCAAAAATGGATTAC-3' and reverse 5'-ACTAGTTCATCTAGTTGACAACAGATTTATG-3', *MtSYMREM1* with the forward 5'-AGATCTGCTGTAACCTAGAGATACATTATGG-3' and reverse 5'-CCCGGGCTAACTGAAAACCTTAAACCGCTGA-3', and *LjLNP* with the forward 5'-CTCGAGGCATTGGACTAAAGCCATGG-3' and reverse 5'-CCCGGGCAGGCTTAGCAGGTACTAGTA-3' primer sets. The *OsRCg2* promoter, 1656-bp region upstream to the ATG codon of the *OsRCg2* gene (LOC_Os10g40430) (Xu et al. 1995), was isolated from genomic DNA of rice (*Oryza sativa*, cv. Murasaki R86) by PCR using promoter specific forward (5'-ACCGTCTGCAGCTGATCTCAACAGT-3') and reverse (5'-CTCGAGGGATGCAGCTAGCGAGCTAGTGAT-3') primers (Supplementary Table S1). All PCR amplifications (see Supplementary Table S2 for PCR conditions) were performed using Advantage-2 polymerase mix (Takara Bio USA, Inc.). Restriction sites were included into the PCR primers to enable cloning of the amplified DNA products. All PCR-amplified promoter or gene products were initially cloned into pGEM-T Easy vector (pGEMTE; Promega, Madison, USA) and sequence-verified to confirm their fidelity, prior to assembling them into intermediate vectors for generating expression cassettes.

The plant transformation vector carrying the linked expression cassettes of the legume nodulation-specific *MtNFP*, *MyLYK3*, *MtSYMREM1*, and *LjLNP* genes was constructed utilizing the pSAT-RCS2-HPT modular vector system (Chung et al. 2005). Initially, intermediate vectors were modified as described below to make them amenable for receiving the PCR-amplified genes and promoters for assembling them into expression cassettes. Modification of pUbi.Tm1: A part of the polylinker/multicloning site (MCS: BamHI, XmaI, and KpnI) downstream of the maize ubiquitin promoter in the pUbi.tm1 vector (Wang and Waterhouse 2000) was replaced with a new synthetic polylinker containing BamHI, SpeI, XmaI, and KpnI sites (Supplementary Table S3) to generate pUbi-MCS-Tm1. Development of pWAct1-MCS-nosT: First, the rice Actin1 promoter from pWAct.GUS (M-B. Wang, CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia, cited in Schünmann et al. 2003) was amplified using PrAct1-For (5'-AGCATACTCGAGGTCATTCATATG-3') and PrAct1-Rev (5'-CTCCATGGGTCGACTCTACCTACAAAAAAGCTCCGACG-3') primers (Supplementary Table S1), and then,

the PCR product was digested with XhoI and NcoI, and re-cloned into the correspondingly digested pWAct.GUS, replacing the original Act1 promoter; this cloning step permitted the insertion of a SalI site upstream of NcoI site at the 3'-end of the Act1 promoter in the pWAct.GUS. This newly modified vector was designated as pWActS-GUS. Subsequently, the GUS coding sequence in the pWActS-GUS was excised out by digesting with SalI and KpnI, and replaced with a similarly digested synthetic polylinker containing the MCS of SalI, XbaI, XmaI, SpeI, and KpnI (Supplementary Table S3), resulting in the plasmid pWAct1-MCS-nosT. Development of the promoterless pS3AWoP-masT, pS4AWoP-35ST, and pS6AWoP-agsT vectors: Mannopine synthase (*mas*), 35SCaMV, and RbcS promoters in the pSAT3A, pSAT4A, and pSAT6A (Chung et al. 2005), respectively, were excised out using AgeI and BglII and replaced with a synthetic AgeI/BglII adaptor (5'-CCGGTCTCCAGTGACATA-3' and 5'-GATCTATGTCAGTGGAGA-3') (Supplementary Table S3), giving rise to pS3AWoP-masT, pS4AWoP-35ST, and pS6AWoP-agsT vectors.

Development of pS6A-ZmUbiP-MtNFP-Tm1, pS4A-OsAct1P-MtLYK3-nosT, pS3A-OsRCg2P-LjLNP-masT, and pS5A-MtSYMREM1-masT auxiliary vectors For developing pS6A-ZmUbiP-MtNFP-Tm1 intermediate vector, first, *MtNFP* was isolated by restricting the pGEMTE-MtNFP with BglII and KpnI and cloned into BamHI and KpnI digested pUbi-MCS-Tm1, resulting in the pUbi-MtNFP-Tm1 primary intermediate vector. Subsequently, ZmUbiP-MtNFP-Tm1 expression cassette was excised out from pUbi-MtNFP-Tm1 by digesting with HindIII and NotI and cloned into similarly digested pS6AWoP-agsT (by replacing *agsT*) to generate pS6A-ZmUbiP-MtNFP-Tm1 vector.

pS4A-OsAct1P-MtLYK3-nosT was generated by routing the *MtLYK3* coding sequence via pWAct1-MCS-nosT vector. This was achieved initially by isolating *MtLYK3* from pGEMTE-MtLYK3 by digesting with EcoICRI and SpeI, and cloning into SmaI-SpeI restricted pWAct1-MCS-nosT to develop pWAct1-MtLYK3-nosT. Subsequently, the Act1-MtLYK3-nosT expression cassette was isolated from pWAct1-MtLYK3-nosT by digesting with XhoI-NotI and inserted into analogously restricted S4AWoP-35ST (by replacing 35ST) giving rise to pS4A-Act1-MtLYK3-nosT.

For developing pS3A-OsRCg2P-LjLNP-masT vector, the AgeI-XhoI restricted *OsRCg2* promoter was obtained from pGEMTE-OsRCg2 and cloned into similarly digested pS3AWoP-masT to produce pS3A-OsRCg2P-masT. Later, *LjLNP* was derived from pGEMTE-LjLNP by digesting with XhoI-XmaI and ligated into correspondingly digested pS3A-OsRCg2P-masT to generate pS3A-OsRCg2P-LjLNP-masT.

Finally, pS5A-MasP-MtSYMREM1-masT was developed by first cloning the XhoI-XmaI restricted *MtSYMREM1*, derived from pGEMTE-MtSYMREM1, under the

transcriptional control of MasP-masT in the similarly digested pSAT3A, giving rise to pS3A-MasP-MtSYMREM1-masT. Consequently, the expression cassette MasP-MtSYMREM1-masT was excised by digesting with AgeI-NotI from pS3A-MasP-MtSYMREM1-masT and moved into analogously digested pAUX3132 (equivalent to S5A devoid of any promoter/terminator) (Goderis et al. 2002) to generate pS5A-MasP-MtSYMREM1-masT.

Development of the binary plant transformation vector pPhL

To achieve this, the expression cassettes *ZmUbiP-MtNFP-Tm1*, *OsAct1P-MtLYK3-nosT*, *OsRCg2P-LjLNP-masT*, and *MasP-MtSYMREM1-masT* were released from the auxiliary vectors pS6A-ZmUbiP-MtNFP-Tm1, pS4A-OsAct1P-MtLYK3-nosT, pS3A-OsRCg2P-LjLNP-masT, and pS5A-MtSYMREM1-masT by digesting with PI-PspI, I-SceI, I-PpoI, and I-CeuI, respectively, and sequentially assembled in that order at the corresponding restriction sites in pRCS2-HPT binary vector (Fig. 1a) (Chung et al. 2005), thus finally generating a composite plant transformation vector carrying the linked expression cassettes of *PrOcs:HPT:ocsT* + *PrOsRCg2:LjLNP:masT* + *PrOsAct:MtLYK3:nosT* + *MasP:MtSYMREM:masT* + *PrZmUbi:MtNFP:Tm1* (Fig. 1b). This composite binary plant transformation vector was designated as pPhL.

Generation of Transgenic Plants and Confirmation of Transgene Presence

Mature seeds of rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, cv. Murasaki R86) were surface-sterilized and used for callus induction according to Sreevidya et al. (2005). To obtain transgenic rice plants, embryonic calli were transformed with the composite plant transformation vector pPhL carrying four expression

cassettes (see above) employing particle bombardment protocol (<http://www.staceyab.missouri.edu/biostatic-transformation-of-rice>) using GJ-1000 High-pressure Gas Gene Gun (Ningbo Scientz Biotechnology Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang, China). Putatively transformed calli were selected for hygromycin resistance and regenerated according to Toki et al. (2006) with some modifications (phytohormone concentration in REIII medium was adjusted to NAA 0.1 mg/L and kinetin 2 mg/L).

Presence of transgenes in putative transgenic rice plants was confirmed by PCR using plant DNA extraction and amplification kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the gene-specific primers for *MtNFP* (MtNFP 5'-F: 5'-GCCT TCTTCTTCTCTCTAG-3' and MtNFP 3'-R: 5'-GTAA CTTATCTGCAGTCTCG-3'; fragment size 0.864 kb), *MtLYK3* (MtLYK3 5'-F: 5'-GTGTGATGTAGCTTTAGCTT C-3' and MtLYK3 3'-R: 5'-GATACGTAACCTCTGTCGAC TTTG-3'; 0.853-kb fragment), *MtSYMREM1* (MtRem-F: 5'-AGATCTGCTGTAACCCTAGAGATACATTATGG-3' and MtRem-R: 5'-CCCGGGCTAACTGAAAAACCTTAAAC CGCTGA-3'; 0.7-kb fragment), and *LjLNP* (LjLNP-F: 5'-CTCGAGGCATTGGACTAAAGCCATGG-3' and LjLNP-R: 5'-CCCGGGCAGGCTTAAAGCAGGTAAGTACTAGTA-3'; 1.3-kb fragment) under PCR conditions described in the Supplementary Table S2. PCR-confirmed transgenic plants were hardened on vermiculite supplemented with Yoshida nutrient solution (Yoshida et al. 1976) and subsequently shifted to soil and maintained in the greenhouse. Wild type or the plants transformed with the empty vector pRCS2-HPT (Ortiz-Berrocal et al. 2017) served as controls.

Rice plants confirmed for the presence of all four legume transgenes were designated as PhL plants and the plants transformed with the empty vector pRCS2-HPT were termed as RMh plants (from now on, RMh plants will be called “vector control RMh plants”).

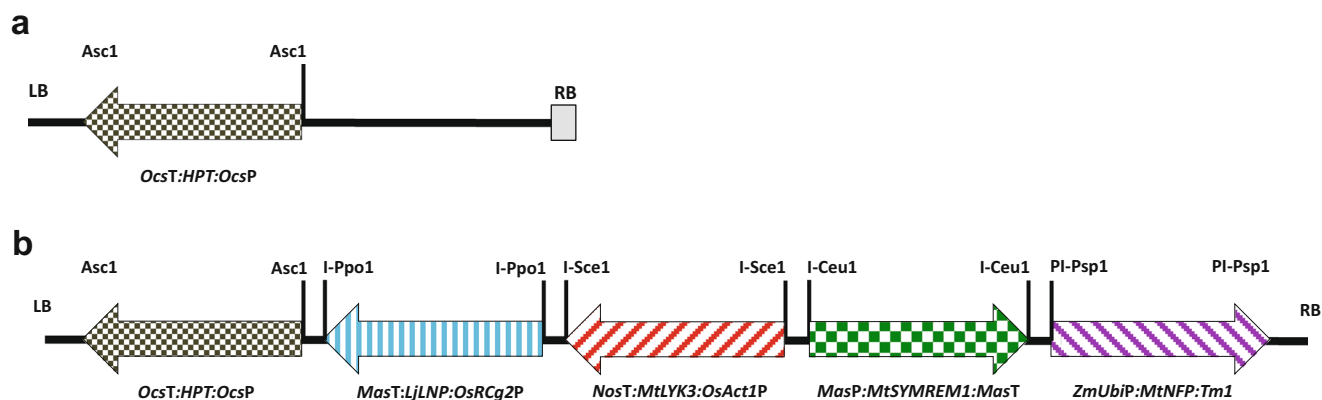


Fig. 1 Schematic representations of the **a** pRCS2-HPT vector and **b** pPhL transformation vector carrying expression cassettes of *M. truncatula* LysM domain-containing receptor-like kinase 3 (*MtLYK3*), *M. truncatula* SYMBIOTIC REMORIN 1 (*MtSYMREM1*), *M. truncatula* Nod factor perception (*MtNFP*), *L. japonicus* lectin nucleotide phosphohydrolase (*LjLNP*) and hygromycin phosphotransferase

(*HPT*-selection marker) genes. *OcsP*, octopine synthase promoter; *OsRCg2P*, rice protease inhibitor/seed storage/LTP family protein promoter; *OsAct1P*, rice actin 1 promoter; *MasP*, mannopine synthase promoter; *ZmUbiP*, maize ubiquitin promoter; RB, right border; LB, left border. Diagram not drawn to the scale

Transgenic plants were also confirmed by Southern analysis as follows: Genomic DNA was isolated from young leaves according to Dellaporta et al. (1983), digested with HindIII (for vector control RMh plants) or BamHI (for PhL plants), separated on 0.8% agarose gel, transferred to Hybond-N⁺ nylon membrane (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), and hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled *HPT* (for RMh plants) or *NFP* (for PhL plants). Probe preparation, hybridization, stringent washes, blocking, and chemiluminiscent detection were performed following the instructions of the manufacturer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Preparation of Rhizobial Strains

The plasmid pDG77-FITA-DO was developed by inserting the hybrid *nodD* (FITA, flavonoid-independent transcription activator) gene derived from pMP604 (Spaink et al. 1989) into pDG77 (Gage 2002) carrying the reporter system DsRed. This plasmid was introduced into the rhizobial strains *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *Rhizobium* NGR234- Ω -nodD2 by triparental mating, using *Escherichia coli* Hb101 harboring pDG77-FITA-DO plasmid as a donor and *E. coli* pRK600 as a helper strain. Transformed rhizobial strains were grown in TY medium (tryptone 6 g/L, yeast extract 3 g/L, CaCl₂ 0.38 g/L) supplemented with appropriate antibiotics (nalidixic acid 20 μ g/mL plus tetracycline 12.5 μ g/mL for *S. meliloti* pDG77-FITA-DO, and rifampicin 100 μ g/mL plus kanamycin 50 μ g/mL and tetracycline 12.5 μ g/mL for *R. NGR234- Ω -nodD2* pDG77-FITA-DO) in dark at 30 °C and 200 rpm for 24 h, and used for inoculating rice seedlings to evaluate root hair deformation and rhizobial colonization in roots.

Nod Factor Isolation

For NF purification, we have employed NF overproducing strains of *S. meliloti* pDG77-FITA-DO and *R. NGR234- Ω -nodD2* pDG77-FITA-DO following the protocol of Cárdenas et al. (1995) with some modifications. Briefly, first the rhizobial strains were grown in dark at 30 °C and 200 rpm for 48 h in 100 mL of TY medium supplemented with appropriate antibiotics. Later, these rhizobial cultures were inoculated into 3 L of B-medium without antibiotics and grown under the conditions described above for 48 h. Subsequently, NFs were extracted with 600 mL of water-saturated *n*-butanol, dried under vacuum and reconstituted with 20 mL of 60% aqueous acetonitrile with vigorous shaking. Purification was done first using octadecyl (C18) extraction columns (J.T. Baker, Deventer, Holland) and later by reverse-phase Waters HPLC system (Waters Associates Inc., Milford, MA). The HPLC separation was performed at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹, with monitoring of eluents at 206 nm.

Eluent fractions corresponding to a pre-verified peak (identified based on the ability to induce root hair deformation—see below) were pooled and dried (Lopez-Lara et al. 1995). Finally, NFs were dissolved in 0.1% CHAPS [(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)], and concentration was calculated based on peak intensity in comparison with a reference NF of the LCO NodRlv-V (Spaink et al. 1991).

Biological activity of the isolated NFs was evaluated, using a concentration of 10⁻⁹ M, for their ability to induce root hair deformation on 3-day-old *Medicago sativa* seedlings germinated from surface sterilized seeds on N-deprived Summerfield medium (Summerfield et al. 1978). After confirming the efficacy of the isolated NFs on *M. sativa*, they were used for studies on rice.

Root Hair Deformation Assays in Rice Using Rhizobial Inoculation and NF Treatments

First, T₂ seeds from segregating transgenic PhL rice plants were surface-sterilized and germinated on Yoshida medium (Yoshida et al. 1976). After 8 days, seedlings were analyzed by PCR for the presence of transgenes, and the PCR-confirmed T₂ plants were transferred to tubes containing 30 mL of agarized N minus Yoshida medium and inoculated with 1 mL of rhizobial suspension (*Rhizobium* NGR234- Ω -nodD2 pDG77-FITA-DO or *S. meliloti* pDG77-FITA-DO; OD₆₀₀ = 0.2). Eight days post-inoculation, seminal and crown roots were observed under light microscope and number of deformed root hairs per unit length root was accounted for at the differentiation/maturation zone.

For treatment with NFs, 8-day-old seedlings derived from the surface-sterilized T₂ seeds obtained from the segregating transgenic rice populations were PCR-confirmed for the presence of transgenes and transferred from the N-sufficient to N-deficient Yoshida liquid medium (the lower part of the tubes was covered with aluminum foil to avoid exposure of roots to light). Later, after 24-h incubation, the plants were supplemented with 10⁻⁹ M purified NFs of *S. meliloti* or *Rhizobium* NGR234 and observations were scored for root hair deformation after 1 day. Seedlings treated with 0.001% CHAPS served as control. The results obtained with the PhL transgenic plants were compared with the similarly treated vector control RMh plants.

Statistical Analysis

The percentages of root hair deformation in RMh and PhL plants subjected to treatments with the *Rhizobium* NGR234 and *S. meliloti* NFs and the rhizobial inoculation were evaluated separately with two-way analysis of variance (ANOVA), using type III sum of squares (R ver. 3.12014). Percentages of deformed root hairs were angular transformed to improve

normality and homogenize variances. In order to perform the analysis, a model simplification-based approach of Crawley (1993) was followed in which the maximal model (containing all factors and interactions) was initially fitted and then simplified by step-wise deletion tests, starting with the interaction and then the main effects. Terms not statistically significant were removed, and the treatment levels reduced in case of no statistical differences in comparisons between the simplified model and the full model. After model simplification, we used Tukey's honestly significant difference test to compare the means of each treatment category.

Gene Expression Analysis

RNA isolation, library preparation, and high-throughput sequencing were performed as previously reported (Ortiz-Berrocal et al. 2017).

Plant Cultivation and RNA Isolation Surface-disinfected T₂ seeds from PhL and vector control RMh lines were germinated in vitro, PCR-confirmed, and grown in 80-mL culture tubes containing liquid Yoshida medium for 2 months in sterile conditions in growth room at 28 °C and 16-h/8-h light/dark photoperiod; roots were protected from light by covering the lower portion of tube with aluminum foil. Later, the plants were taken out, roots were rinsed with sterile Yoshida medium lacking nitrogen, and the plants were shifted to N-free Yoshida medium for a day and then treated for 24 h with *S. meliloti* NFs (10⁻⁹ M). N-deprived Yoshida medium augmented with CHAPS served as control. Subsequently, roots derived from individual plants (three biological replicates for each treatment) were obtained and total RNA was prepared from 50 mg of liquid nitrogen-frozen roots of PhL and vector control RMh transgenic plants using Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA). Purity of RNA samples was assessed using Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

RNA-seq Analysis Total RNA samples (≈ 20 μg) with values of OD_{260/280} between 2.13 and 2.16 and OD_{260/230} between 2.19 and 2.22 were sent to Beijing Genome Institute (BGI) Americas Laboratory (Tai Po, Hong Kong) for Illumina HiSeq 2000 high-throughput sequencing (quantification). RNA-seq was performed with RNA samples isolated from the root samples derived from three plants each of RMh and PhL plants subjected or not to NF treatment ((A) RMh untreated, (B) RMh treated with NFs, (C) PhL untreated, and (D) PhL treated with NFs). After sequencing, the quality of raw reads was assessed with FastQC software (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and trimmed with Trim Galore v0.3.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trimgalore/>). Subsequently, reads were aligned to the *O. sativa* CDS collection (Os-Nipponbare-Reference genome

V 7.1; <http://rice.plantbiology.msu.edu/>) using Bowtie aligner (Langmead et al. 2009), with the ensuing parameters: bowtie -aS -X 800 -offrate 1 transcripts -1. Expression of transgenes was confirmed through aligning reads to the FASTA file of *MtLYK3*, *MtNFP*, *MtSYMREM1*, and *LjLNP* coding sequences with the aligner BWA version 0.7.12-r1039 (Li and Durbin 2009).

Differential expression analysis between samples was performed with the NOISeq version 2.6.0 using non-parametric Noiseq-sim method, which simulates technical replicates from a multinomial distribution to estimate differential expression probabilities, with the recommended *q* value of 0.9 (Tarazona et al. 2015). Noiseq-sim was used with the following parameters: size of simulated sample (pnr) = 0.2, number of simulated replicates (nss) = 5, allowed variability (v) = 0.02. Enrichment analysis of Gene Ontology (GO) terms was based on the TopGO v. 3.0.2. (Alexa and Rahnenführer 2016), and a *P* value of 0.05 was used to define the most significant GO terms. Differentially expressed genes (DEGs; |log₂ ratio| ≥ 1.5) in the root samples were compared in combinations of C vs A, B vs A, and D vs C. The presence and distribution of all up- and downregulated DEGs in different pathways were analyzed with the KEGG PATHWAY database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (Tanabe and Kanehisa 2012). Heatmap representations for the DEGs in the KEGG pathways were done using gplots package v2.14.2 in R software environment (<https://www.r-project.org/>).

RT-PCR for Evaluation of Transgene Expression RNA isolation and RT-PCR for evaluation of transgene expression in roots were performed according to Ortiz-Berrocal et al. (2017). Transgene expression was evaluated in 2-month-old PhL plants grown in Yoshida solution and then incubated in N-deprived Yoshida solution for 2 days prior to analysis. cDNA was prepared from 3 μg of freshly isolated, DNase-treated RNA using RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, EU, Lithuania). Transgene expression was assessed by PCR using gene-specific primers (Supplementary Table S1).

Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis

To validate the RNA-seq results, real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) analysis of transcript abundance was performed with selected DEGs using three biological replicates with two technical replicates. Total RNA (2 μg) was used as template to synthesize cDNA using the RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA removal, cDNA synthesis, and quality verification for RT-qPCR were performed as reported (Hernández et al. 2007; Ramírez et al. 2013). Resulting

cDNAs were then diluted to 60 μ L, and 0.066 μ g (2 μ L) of cDNA was used per RT-qPCR reaction. Reactions were performed in a 96-well format Real-Time PCR System and 7300 System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) following the manufacturer's instructions. The primers used for RT-qPCR are as follows: nicotianamine synthase (LOC_Os03g19420.1), OsNS-F (CTGAGTGC GTGCATAGTAATCC) and OsNS-R (ACCTCTTG CTTTCTCAGCACC); expressed protein 1 (LOC_Os02g33070.1), OsEP1-F (TCGCCAACCTGAT CCGCTG) and OsEP1-R (TTCTTGACTCCTTCCCACT GTACAG); glutathione S-transferase GSTU6 (LOC_Os10g38340.1), OsGST-F (CCAGTTGAAGTTG CTGAATCC) and OsGST-R (TAGAATAGCCACTT CCCAC); oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein (LOC_Os04g27060.1), OsAKR-F (ACGTTGTGCAAGGT GACAG) and OsAKR-R (CACATGGCAAAAAC ACTGGAACA); major facilitator superfamily antiporter (LOC_Os11g04020.1), OsMFSA-F (TTGCGTTGACCTT C AAGCCG) and OsMFSA-R (GTCTATGCTTGCAT CCACGC); expressed protein 2 (LOC_Os08g05960.1), OsEP2-F (TGCTAGTGTGCTAGGGAGG) and OsEP2-R (CAACAGGATAACGAGTACAGAGC); transketolase (LOC_Os07g09190.1), OsTK-F (GCACTTCAGCTCAG CTGAA) and OsTK-R (CAAGAAACACATACATGG GC); B12D protein (LOC_Os07g41350.1), OsB12D-F (GTGACCGTCAAACTGATCC) and OsB12D-R (TAAGTTCGCACGTATGCGAC). Relative expression was calculated using the comparative Ct method (Livak and Schmittgen 2001). The threshold cycle (Ct) value obtained in each reaction was normalized with the geometrical average of Ct values of expression levels of three reference genes, namely protein kinase 1 (LOC_Os06g48970.1), an expressed protein (LOC_Os07g02340.1), and a nucleic acid binding protein (LOC_Os06g11170.1) (Narsai et al. 2010). The Student *t* test was performed with a *P* value cutoff of 0.05.

Results

Vector Construction, Genetic Transformation, and Characterization of Transgenic Rice Plants

To make rice plant amenable to perceive and transmit Nod signal appropriately, we chose to express legume-specific NFRPs—two NF-perceiving LysM-Receptor-like Kinases (MtNFP and MtLYK3) together with their interacting protein MtSYMREM1, and a NF-recognizing lectin nucleotide phosphohydrolase (LjLNP)—in rice. *MtSYMREM1* was included because it was shown to be a scaffolding symbiotic receptor-binding protein that specifically interacts with the core set of symbiotic receptor kinases (MtNFP and

MtLYK3) that are essential for Nod signal perception (Lefebvre et al. 2010). It is worthwhile to mention here that the closest homologue of MtSYMREM1 in rice is poorly conserved, with only 41% identity at amino acid level (LOC_Os04g45070). Hence, we chose to use the legume *MtSYMREM1* to replicate Nod factor receptor system (MtNFP and MtLYK3 together with their interacting protein MtSYMREM1) in rice similar to that in legumes. Lectin nucleotide phosphohydrolase (LjLNP) was included in the study because it possesses not only a NF binding domain but also a lectin binding domain. The lectin binding domain enables close interaction with lectins present on surface of rhizobia (Roberts et al. 1999) and aids in bringing about intimate association of bacteria with root epidermal cell surface including root hairs (Sreevidya et al. 2005). It has been suggested that the close association may facilitate accumulation of NFs secreted by rhizobia to reach critical concentrations at root surface to foster cellular reactions effectively (Goedhart et al. 2000).

For this purpose, we generated the plant transformation vector pPhL carrying linked expression cassettes of *MtNFP*, *MtLYK3*, *LjLNP*, and *MtSYMREM1* (isolated from the legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*) genes respectively driven by constitutive promoters *ZmUbiP*, *OsActP*, *OsRCg2P* (from *Zea mays* and *Oryza sativa*), and *MasP* (from *Agrobacterium tumefaciens*) (Fig. 1b), and used for genetic transformation of rice. Transformation of rice (*O. sativa* R86) was achieved by biolistic bombardment of the pPhL vector into rice calli. Plants transformed with the empty vector pRCS2-HPT (pRMh; Fig. 1a) (Ortiz-Berrocal et al. 2017) served as controls.

A total of 116 and 73 putative transgenic PhL and vector control RMh plants, respectively, were regenerated and analyzed by PCR amplification for the presence of transgenes. PCR analysis confirmed 63 PhL plants positive for all transgenes (*MtNFP*, *MtLYK3*, *LjLNP*, and *MtSYMREM1*) and 6 vector control RMh plants positive for *HPT* gene. Out of 63 PhL plants cultivated, only 3 plants turned out to be fertile and produced limited number of seeds (approximately 20 seeds in each T₀ PhL plants) compared with vector control RMh plants, which produced abundant number of seeds, about 80% filled seeds in each panicle (an average of 33 seeds per panicle, typically producing > 500 seeds per plant) (Table 1; Fig. 2). Pollen viability as tested by staining with KI or NBT was found to be less than 5% in T₀ PhL plants as compared with about 45% in vector control RMh plants (pollen viability in wild type plants was similar to RMh plants). In PhL plants, however, from T₂ generation onwards, seed production improved to about 40% of filled grains per panicle. Excepting for pollen viability and seed production, no other significant phenotypic differences were observed among flowers, leaves, tillers, or roots in PhL plants compared with wild type or vector

Table 1 Generation of transgenic rice plants. Transgenic rice (*Oryza sativa* L. cv. Murasaki R86) plants were obtained by biolistic transformation of embryogenic calli with the binary vectors pRMh or pPhL. Putative transformed calli were selected on medium containing

hygromycin. Presence of transgenes in regenerated plants was confirmed by PCR and copy number was determined by Southern blot analysis

Transformation vector	Transgenes	No. of regenerated plants	No. of positive plants	No. of plants with seeds	Transgene copy number
RMh	<i>HPT</i>	73	6	6	2
PhL	<i>HPT</i> + <i>MtLYK3</i> + <i>MtNFP</i> + <i>MtSYMREMI</i> + <i>LjLNP</i>	116	63	3	6

control RMh plants. Nevertheless, in contrast to the vector control RMh plants, in old T₀ PhL plants, occasionally branched out tillers were developed from the main tillers (not shown).

Southern analysis revealed the presence of 6 copies of transgenes (with the same banding pattern) in all three fertile PhL plants suggesting that they all arose from a single transformation event (Supplementary Fig. S1). *HPT* gene copy number in all six vector control RMh plants was found to be 2 (Ortiz-Berrocal et al. 2017).

The RT-PCR analysis showed that in roots of PhL plants, relative to the expression level of the rice housekeeping elongation factor Tu gene (LOC_Os03g08020), *MtNFP*, *MtLYK3*, and *MtSYMREM*, transgene abundance was about 60–90% higher than that of *LjLNP* (Fig. 2g).

Response of Root Hairs to Rhizobial Inoculation and Nod Factor Treatment in Transgenic PhL Rice Plants

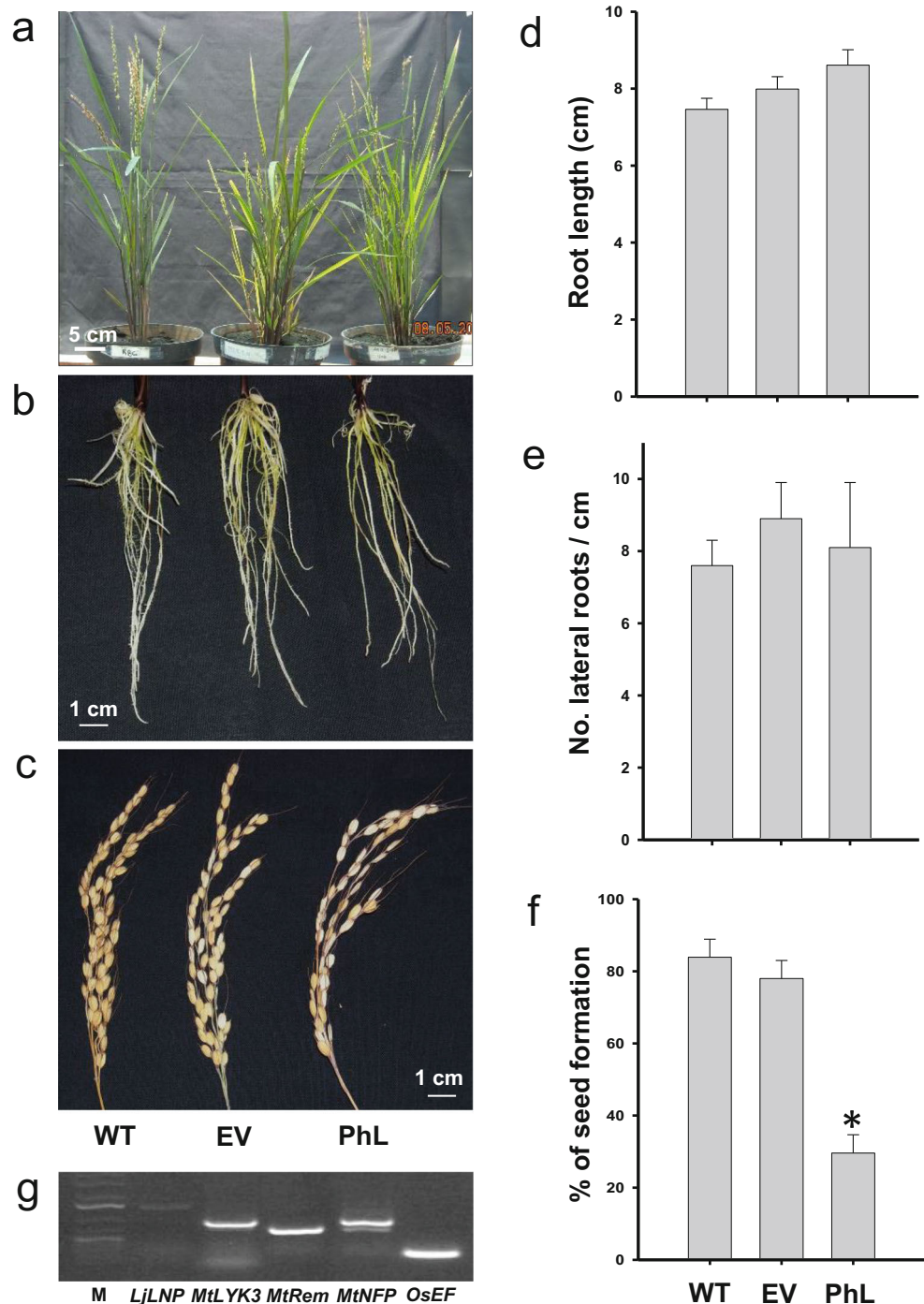
To assess whether the expression of NFRPs enables PhL plants receptive to rhizobial inoculation, PCR-confirmed T₂ transgenic plants (generated from surface sterilized seeds) grown in N-deprived Yoshida medium were challenged with *S. meliloti* or *Rhizobium* NGR234 and analyzed for their responsiveness in terms of exhibiting root hair deformation in roots. The former strain was selected because PhL plants express NF receptor-like kinases from *M. truncatula* that specifically recognize NFs from *S. meliloti* (Arrighi et al. 2006; Limpens et al. 2003), and the latter strain was chosen as it is highly promiscuous and capable of interacting symbiotically with a range of legume species that express a wide variety of NF receptor kinase proteins (Relić et al. 1993). As described in “Materials and Methods,” both these strains were marked with *DsRED* (Gage 2002) to facilitate easy observation and carried *FITA* gene (Spaink et al. 1989) to aid production of NFs independently of inducer-flavonoids.

Microscopic examination revealed that the inoculated rhizobial cells were found growing in close proximity with outer surface of root hairs in both PhL and vector control RMh plants (Fig. 3a, c). On the other hand, colonization of rhizobia on root surface as well as at the sites lateral root emergence

was found to be less dense in PhL plants as compared with vector control RMh plants (compare Fig. 3d with b). In case of the inoculated PhL plants, however, root hairs exhibited subtle but consistent deformations (such as curved and swollen tips, protuberances on root hairs) in root hairs localized in the differentiation/maturation zone of roots (Fig. 4e, f) as compared with the counterparts in the vector control RMh plants (Fig. 4b, c). In particular, root hairs in the PhL plants inoculated with *S. meliloti* showed relatively more conspicuous hook formation at their tips than the root hairs inoculated with *Rhizobium* NGR234 (compare Fig. 4e with f). Root hairs of uninoculated plants in both vector control RMh and PhL plants showed deformations rarely (Fig. 4a, d). The percentages of root hair deformation in transgenic plants subjected to inoculation treatments with *Rhizobium* NGR234 and *S. meliloti* were separately validated using two-way analysis of variance (ANOVA) (see “Materials and Methods”). In contrast to the microscopic observations, ANOVA indicated no significant differences in percentages root hair deformation in PhL and vector control RMh plants (Fig. 4g). The ANOVA full (maximal) model showed that both PhL and vector control RMh plants inoculated with rhizobia presented a significantly higher percentage of deformed root hairs compared with non-inoculated plants ($F_{(2, 25)} = 4.10$, $P = 0.0289$; Fig. 4g). Neither interaction among factors (type of rhizobial strain) nor transgenic plant lines (PhL and vector control RMh plants) were significant ($F_{(1, 25)} = 0.29$, $P = 0.5981$; $F_{(2, 25)} = 0.6525$, $P = 0.5294$; respectively). After the model simplification by elimination of non-significant terms, post hoc comparisons were performed between the means of each category of rhizobial inoculation levels. Both PhL and vector control RMh plants inoculated with rhizobia (*S. meliloti* 1021 and *Rhizobium* NGR234 strains) presented a significantly higher percentage of deformed root hairs compared with non-inoculated plants (Tukey’s HSD; $P = 0.0335$ and $P = 0.0375$, respectively). No significant difference in percentage of deformed root hairs were observed in response to the rhizobial strain (Tukey’s HSD; $P = 0.9987$; Fig. 4g).

To evaluate if root hair deformation was specifically modulated by NFs, we isolated NFs from both *S. meliloti* and *Rhizobium* NGR234 and tested their efficacy in inducing root hair deformation in transgenic rice roots (Fig. 5) and

Fig. 2 Characterization of transformed rice plants. **a, b, c** Phenotype of PhL plants, roots, and panicles compared with wild type and vector control RMh plants. **d** Average root length of seven rice plants grown in Yoshida solution for 22 days post-germination (dpg). **e** Total number of lateral roots in differentiation/maturation zone of seminal roots of five plants 16 dpg in N-deprived Yoshida solution. **f** Percentage of matured seeds in ten panicles. Asterisk indicates percentage of filled seeds in PhL plants that is significantly lower than ($P < 0.001$) in wild type and vector control plants. **g** Transgene expression analysis by RT-PCR in PhL roots. Expression of transgenes was compared with reference *O. sativa* elongation factor Tu (*OsEF*) gene expression

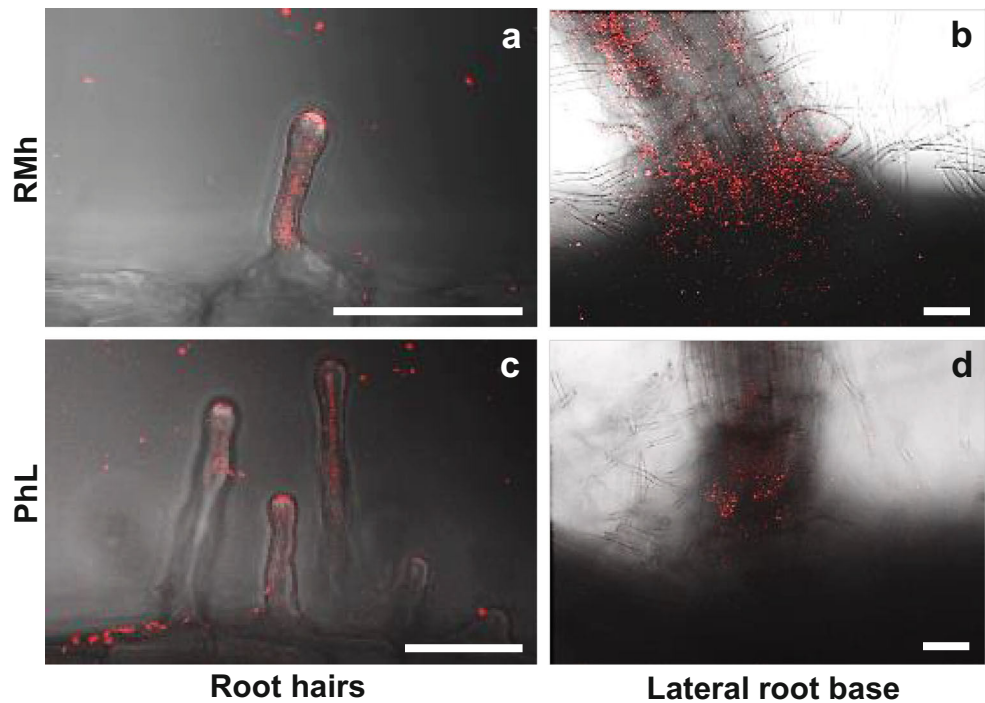


compared them with typical root hair deformations in *M. sativa* treated with the isolated NFs (10^{-9} M) for 24 h (Supplementary Fig. S2). Compared with vector control RMh plants, treatment of PhL plants with *Sm* or NGR NFs induced perceptible and consistent root hair deformations in the root hairs present in root differentiation/maturation zone similar to that induced by inoculation with rhizobial strains (compare Fig. 5b with e and e' and c with f).

In response to NF treatment, percentage of deformed root hairs was significantly higher in PhL plants compared with

vector control RMh plants (Tukey's HSD; $P < 0.0001$), and both PhL and vector control RMh plants treated with NFs showed significantly higher root hair deformation than the plants treated with solvent (control) alone (Tukey's HSD; PhL + NF vs vector control RMh, $P < 0.0001$; PhL + NF vs PhL, $P < 0.0001$; RMh + NF vs PhL, $P < 0.001$; RMh + NF vs vector control RMh, $P < 0.001$) (Fig. 5g). ANOVA indicated that treatment of PhL and vector control RMh plants with NFs from both strains increased the number of deformed root hairs, but more significantly in PhL plants compared with untreated

Fig. 3 Rhizobial colonization in rice roots of **a, b** vector control RMh plants and **c, d** PhL plants inoculated with *Rhizobium* NGR234 marked with DsRED and FITA. Confocal photomicrographs were taken 8 days post-inoculation. Bars, 50 μ m



plants (Fig. 5g). ANOVA full model confirmed that the interaction was significant ($F_{(2, 24)} = 6.76, P = 0.0047$).

Display of root hair deformation in PhL plants in response to NF treatment indicates that the expression of NFRPs confers rice plants the ability perceive NFs more effectively.

Percentage of root hair deformation in NF-treated PhL plants is higher than the ones inoculated with rhizobia. Reason for such variations in levels of root hair deformations is difficult to decipher in the absence quantitative data pertaining to the amount of NFs secreted by rhizobial cells

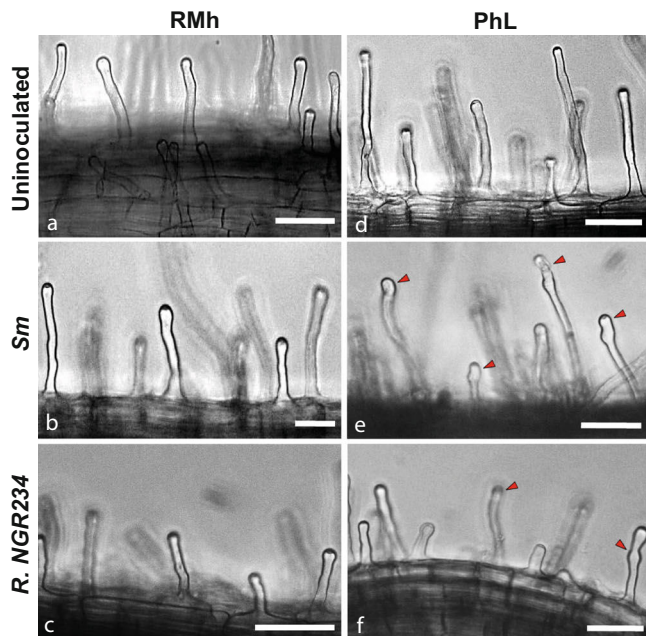
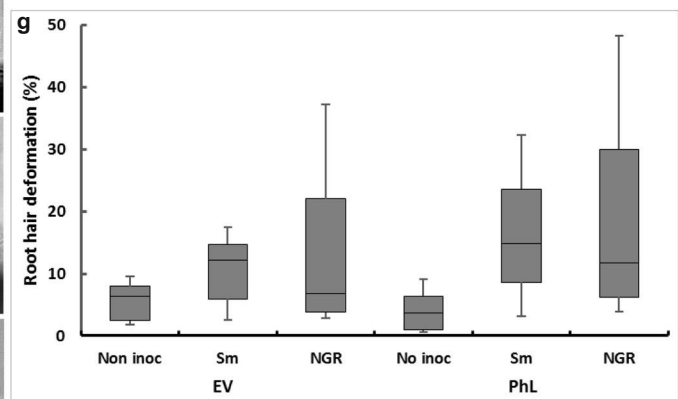


Fig. 4 Response of root hairs in **a–c** vector control RMh plants and **d–f** PhL plants to rhizobial inoculation, 8 dpi. Roots were **a, d** uninoculated (control) or **b–f** inoculated with rhizobial strains marked with DsRED and FITA. **b, e** *S. meliloti* or **c, f** *R. NGR234*. Photomicrographs were taken under compound microscope equipped with bright field optics. Deformations in root hairs are highlighted by arrowheads. Bar =



50 μ m. **g** Box plots of percentages of root hairs showing deformation were accounted from differentiation/maturation zone of seminal root in vector control RMh and PhL plants inoculated with rhizobial strains. Percentages of deformed root hairs represent average values from 5 plants per treatment

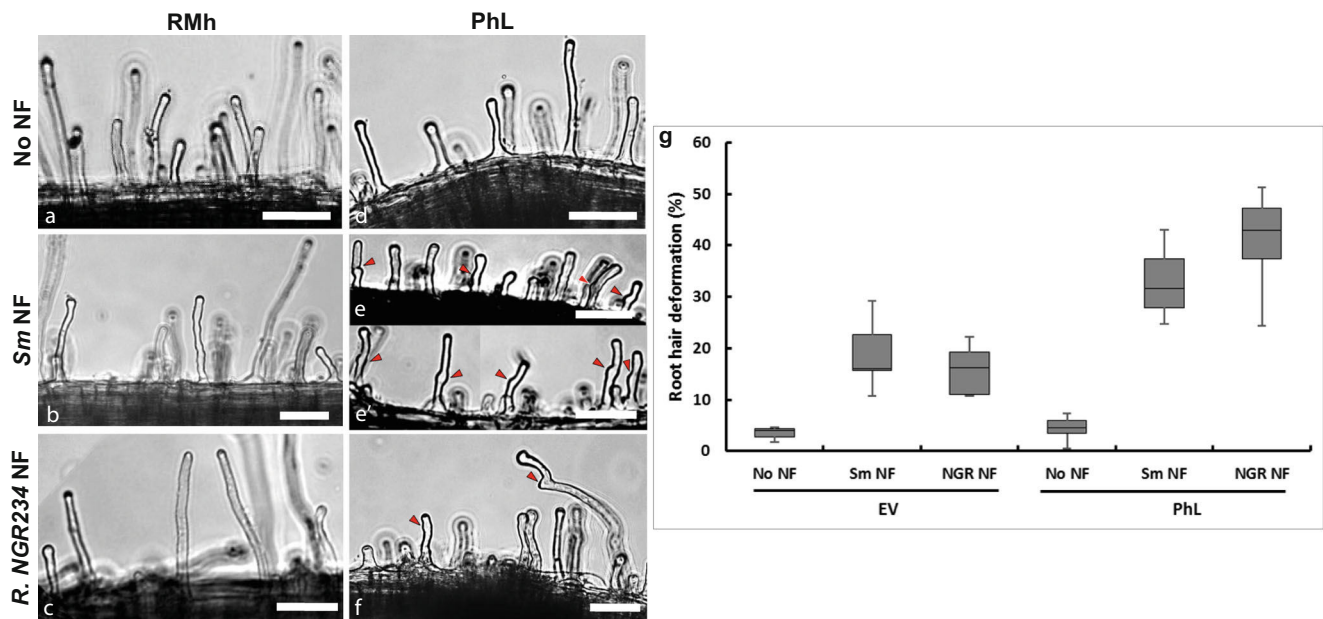


Fig. 5 Response of root hairs in **a–c** vector control RMh and **d–f** PhL plants to 24-h Nod factor treatment. Roots were treated with **a, d** CHAPS 0.001% (no NFs) or **b–f** with Nod factors ($\sim 10^{-9}$ M of **b, e** *S. meliloti* or **c, f** *R. NGR234*). Photomicrographs were taken under compound microscope equipped with bright field optics. Deformations in root hairs are

highlighted by arrowheads. Bar = 50 μ m. **g** Box plots of percentages of root hairs showing deformation were accounted from differentiation/maturation zone of seminal root in vector control RMh and PhL plants treated with Nod factors. Percentages of deformed root hairs represent average values from 5 plants per treatment

in rice root environment. It is likely that the concentration of NFs secreted by rhizobia may be relatively lower than the amount of pure NFs supplied in the medium, hence resulting in lower levels of root hair deformations. However, in the absence of quantitative data on endogenous Nod factor production levels, it is difficult to make a definitive conclusion in this regard.

Transcriptional Response of Rice Roots Due to Expression of NFRPs and Nod Factor Treatment

In order to further explore the influence of NFs on root biology of PhL plants expressing NFRPs, RNA-seq of roots of PhL and RMh plants treated with 10^{-9} M *S. meliloti* NFs or with 0.001% CHAPS for 24 h was performed (see “Materials and Methods” for details). The root RNA samples sent for transcriptome sequencing were derived from (a) vector control RMh plants without NF treatment, (b) vector control RMh treated with *S. meliloti* NFs, (c) PhL without NF treatment, and (d) PhL treated with *S. meliloti* NFs.

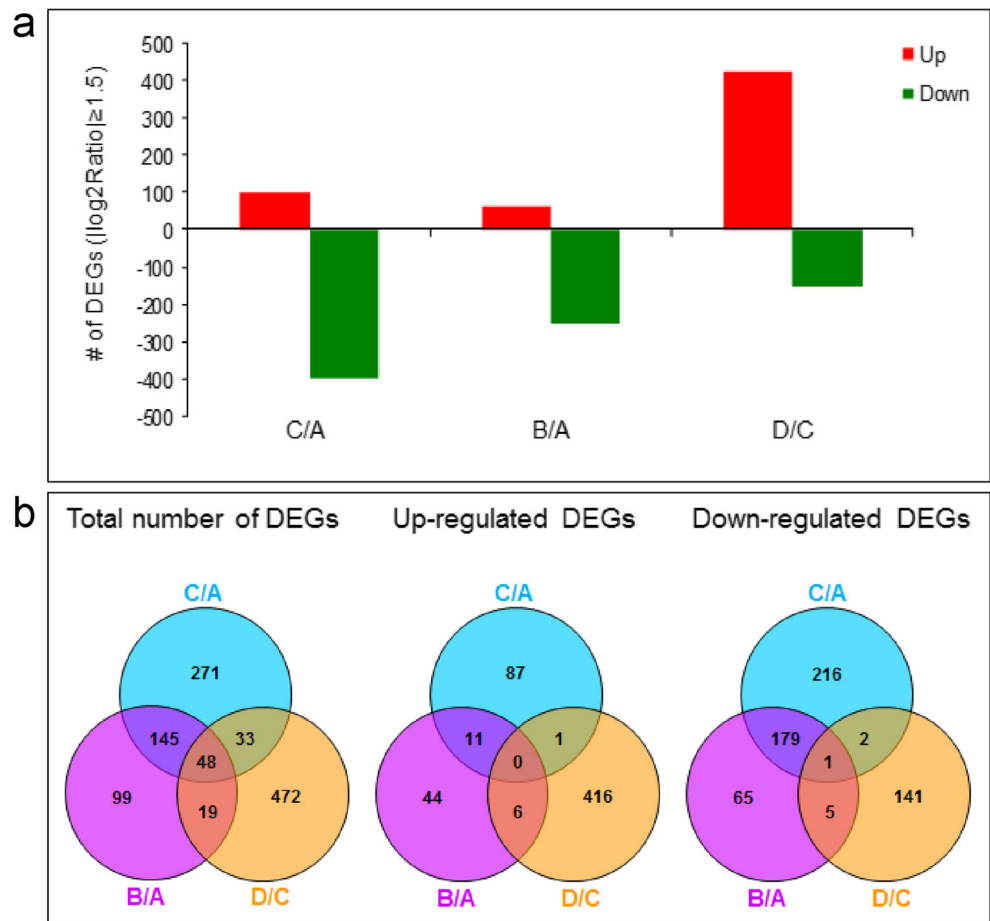
About 24 million reads were generated from polyadenylated RNA libraries for each treatment; of these, around 80% aligned to single positions in rice genome, and 5% aligned at multiple positions. Over 65% of alignments were complete, and between 8 and 18% were accepted with less than 2 bases unpaired. Scatter plots presented in Supplementary Fig. S3 illustrate relative levels of expression of 37,309 genes in roots of vector control RMh and NFRP-expressing PhL plants treated with or without Nod

factors. From these, differentially expressed genes (DEGs) were selected according to $FDR \leq 0.001$ and $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1.5$. A detailed list of the DEGs obtained from comparisons between root samples of PhL and vector control RMh plants treated with or without NFs is provided in Supplementary Table S4. Noiseq-sim algorithm ($q = 0.9$) to analyze differential expression of genes between RNA-seq samples confirmed approximately 80% of DEGs selected previously.

NOIseq-validated deep sequencing data was utilized to analyze transcriptional reprogramming of rice roots both due to the constitutive expression of legume NFRPs and the NF treatment. Transcriptome changes induced in roots due to expression of NFRPs were delimited by comparing the RNA-seq data obtained from PhL plants with the transcript data derived from vector control RMh plants (C/A). Similarly, effect of NFs on transcriptional reprogramming in roots of vector control RMh plants as well as PhL plants was evaluated by comparing transcriptome data derived from NF-treated plants vs mock-treated plants (i.e., comparisons between the samples B vs A and D vs C were made to delineate transcriptional changes induced in roots of vector control RMh and PhL plants, respectively, in response to NF treatment).

RNA-seq analysis revealed that the constitutive expression of legume-specific NFRPs in rice plants (PhL plants) induced downregulation of 398 genes and upregulation of 99 genes in roots as compared with vector control RMh plants (DEGs in “C” compared with “A” in Fig. 6; Supplementary Table S4). NF treatment, however, completely altered the gene

Fig. 6 RNA-seq analysis in Nod factor-treated rice roots. **a** Up- and downregulated genes ($|\log_2\text{ratio}| \geq 1.5$) in roots of vector control RMh and Nod factor receptor protein expressing PhL rice plants treated with or without NFs. **b** Interactive Venn diagrams representing the overlap in number of differentially expressed genes in roots of vector control RMh and PhL rice plants in response to Nod factor treatment. Differentially expressed genes in the roots of PhL vs vector control RMh plants (C/A), Nod factor-treated RMh plants vs untreated RMh plants (B/A) and Nod factor-treated PhL plants vs untreated PhL plants (D/C)



expression profiles in roots of PhL plants—with NF treatment a large number of genes were upregulated (423) compared with fewer downregulated genes (149) (“D” vs “C”). In contrast, in vector control RMh roots, NF treatment induced downregulation of more genes (250) as compared with upregulated genes (62) (“B” vs “A”) (Fig. 6; Supplementary Table S4).

Transcriptome analysis showed that in comparison to RMh roots, the expression of NFRPs in PhL roots (compare “C” vs “A”) induced downregulation of several genes coding for transcription factors (5 up/24 down), kinases (5 up/22 down), and calcium binding proteins (1 up/5 down) associated with signaling and biological processes (Supplementary Figs. S4 and S6–S9a), and those related to plant-pathogen interaction, stress/defense response, secondary metabolites, and phytohormone biosynthetic pathways (Figs. 7 and 8, Supplementary Figs. S4–S16). In contrast, NF treatment massively impacted gene expression in PhL roots, resulting in upregulation of expression of several genes encoding transcription factors (19 up/4 down), kinases (41 up/7 down), and calcium binding proteins (8 up/1 down) mainly associated with various biological and signal transduction pathways (Fig. 8; Supplementary Figs. S4 and S6–S9a) including those involved in plant hormone synthesis and signaling (Supplementary Figs. S15 and

S16), in comparison with similarly treated vector control RMh plants. In addition, NF treatment of PhL plants also activated in roots various genetic networks/genes associated with defense response and secondary metabolites production—specifically, the genes involved in pathways related to plant-pathogen interaction (Fig. 7, Supplementary Fig. S5); phenylpropanoid biosynthesis (Supplementary Figs. S10 and S11); isoflavonoid and flavonoid biosynthesis (Supplementary Figs. S10, S12, and S13); diterpenoid biosynthesis (Supplementary Figs. S10, and S14a); glutathione metabolism (Supplementary Figs. S10 and S14d); and production of hydrolases and chitinases (Supplementary Figs. S6 and S9c), stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis, cutin, suberine and wax biosynthesis (Supplementary Figs. S10 and S14b, c), and various transporters (Supplementary Fig. S4) in roots.

Transcriptional profiles of NFRP-expressing roots indicated that the induction of several genes associated with hormone biosynthetic pathways (except gibberellins) are suppressed relative to the expression in vector control RMh plants (Supplementary Figs. S15 and S16). But intriguingly, NF treatment of the same PhL plants highly upregulated the expression of hormone biosynthetic pathway genes including those associated with gibberellin, ethylene, brassinosteroids,

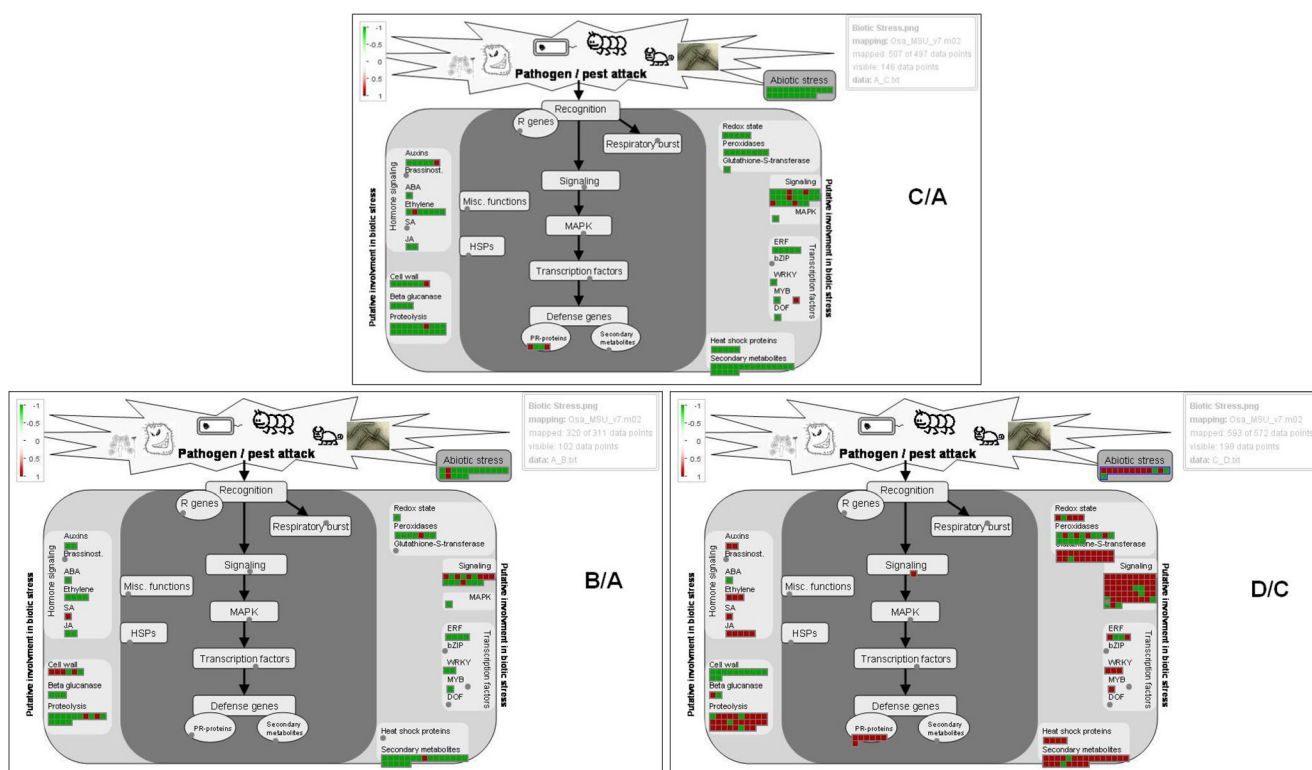


Fig. 7 MapMan diagram representing the differentially expressed genes related to biotic stress in roots of vector control RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. PhL vs RMh plants (C/A), Nod

factor–treated RMh plants vs untreated RMh plants (B/A), and Nod factor–treated PhL plants vs untreated PhL plants (D/C). Red: upregulated and green: downregulated

salicylic acid, jasmonic acid, and auxin biosynthesis, but excluding the genes involved in ABA and cytokinin biosynthesis. In contrast, in roots of vector control RMh plants, Nod factor treatment suppressed the induction of most hormone biosynthetic pathway genes.

Mapping of reads of the expressed transgenes from roots of PhL plants treated with or without NFs was performed to determine the number of reads aligning with the sequences of the transgenes *LjLNP*, *MtLYK3*, *MtNFP*, and *MtSYMREM* used for generating transgenic rice plants. As expected, none of the transgene reads aligned with sequences of transcripts derived from vector control RMh plants transformed with empty vector. On the other hand, 559, 1437, 8182, and 2024 reads respectively aligned with *LjLNP*, *MtLYK3*, *MtNFP*, and *MtSYMREM* transgenes used for transformation of PhL plants (treated with solvent alone), with coverage of 57, 91, 100, and 100% (Supplementary Table S5). In case of the PhL plants treated with NFs, 752, 1706, 12291, and 3335 reads aligned with the transgenes *LjLNP*, *MtLYK3*, *MtNFP*, and *MtSYMREM* with a coverage of 68, 94, 100, and 100%, respectively (Supplementary Table S5). These results are in agreement with the levels of transgene expression evaluated by RT-PCR, in the roots of rice plants carrying *LjLNP*, *MtLYK3*, *MtNFP*, and *MtSYMREM* (Fig. 2g).

It is relevant to mention here that the expression levels of the rice homologues of the legume Nod signal pathway genes, namely *OsLYK3* (LOC_Os08g42580), *OsNFP* (LOC_Os03g13080), *OsSYMRK* (LOC_Os07g38070), *OsPOLLUX* (LOC_Os01g64980), *OsCASTOR* (LOC_Os03g62650), *OsNUP133* (03g12450) *OsNUP85* (LOC_Os01g54240), *OsCCaMK* (LOC_Os05g41090), *OsCYCLOPS* (LOC_Os06g02520), *OsNSP1* (LOC_Os03g29480), *OsNSP2* (LOC_Os03g15680), and *OsERN1* (LOC_Os07g10410), were found to be consistently low in all four RNA-seq samples (A, B, C, and D). Neither the expression of legume NFRPs nor NF treatment altered the expression levels of any of these genes in roots of rice plants (Supplementary Table S6).

On the other hand, with regard to the homologues of downstream early nodulin genes, NF treatment led to upregulation of nodulin2-like gene (Os04g59020) and suppressed the expression of homologues of four *ENOD93* and two *SWEET* genes in roots of the vector control RMh plants (Supplementary Table S7). Expression of legume NFRPs in rice (PhL plants), however, resulted in downregulation of homologues of 10 early nodulin-like genes, including six homologues of *ENOD93*, in roots, but NF treatment caused suppression of only one nodulin-like gene in roots of these PhL plants (Supplementary Table S7).

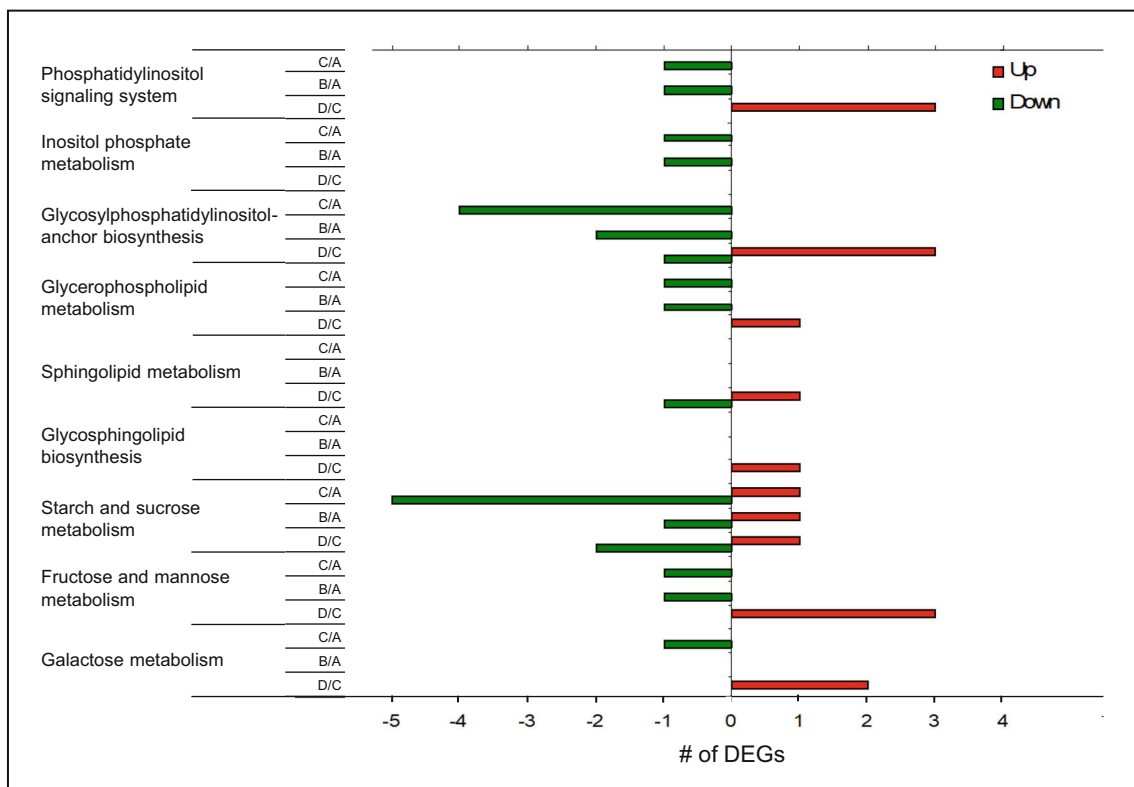


Fig. 8 KEGG analysis of differentially expressed signaling pathway genes ($|\log_2\text{ratio}| \geq 1.5$) in roots of RMh and PhL rice plants treated with and without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants, (B/A) Nod

factor-treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor-treated PhL plants vs untreated PhL plants

Validation of RNA-seq Data by RT-qPCR Analysis

The RNA-seq results were validated by the RT-qPCR analysis of eight upregulated genes in roots of PhL plants treated with NFs, namely nicotianamine synthase (LOC_Os03g19420), expressed protein 1 (LOC_Os02g33070), glutathione S-transferase GSTU6 (LOC_Os10g38340), oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein (LOC_Os04g27060), major facilitator superfamily antiporter (LOC_Os11g04020), expressed protein 2 (LOC_Os08g05960), transketolase (LOC_Os07g09190), and B12D protein (LOC_Os07g41350). Results obtained with RT-qPCR were found to be in agreement with RNA-seq data (Fig. 9).

Discussion

Rice Plants Have Inherent Ability to Perceive Rhizobial Nod Factors

NFs secreted by rhizobial cells play a pivotal role in promoting root infection and symbiotic nodule formation in legumes (Dénarié et al. 1996; Long 1996). Besides their role in the development of nitrogen-fixing symbiosis, NFs were also shown to have a beneficial influence on plant

growth and development, such as promoting cell division, embryogenesis, seed germination, shoot biomass, root growth, lateral root branching, and alleviation of abiotic and biotic stresses in a wide range of legume as well as non-legume plants including monocots like maize, rice, and barley (De Jong et al. 1993; Rohrig et al. 1995; Khan et al. 2002; Souleimanov et al. 2002; Prithiviraj et al. 2003; Atti et al. 2005; Duzan et al. 2005; Olah et al. 2005; Jose et al. 2007; Miransari and Smith 2009; Miransari et al. 2006; Khan et al. 2011; Maillet et al. 2011; Kidaj et al. 2012; Schwinghamer et al. 2015; Sun et al. 2015; Tanaka et al. 2015). Recently, Liang et al. (2013) showed that *Arabidopsis thaliana*, which is neither mycorrhizal nor nodulation competent, is also capable of perceiving NFs.

NFs were found to induce gene expression in monocot plants such as rice. Reddy et al. (1998) using transgenic rice carrying *MtENOD12-GUS* reporter gene showed that NFs are able to induce the activity of *MtENOD12* promoter, indicating that rice has inherent ability to perceive NFs. Liang et al. (2013) found that NFs strongly suppress microbe-associated molecular pattern (MAMP)-triggered immune responses in *Arabidopsis* roots by means of a mechanism that results in diminished levels of pattern-recognition receptors in root plasma membrane. In the present study, transcriptome analysis of roots from vector control RMh plants revealed that NF

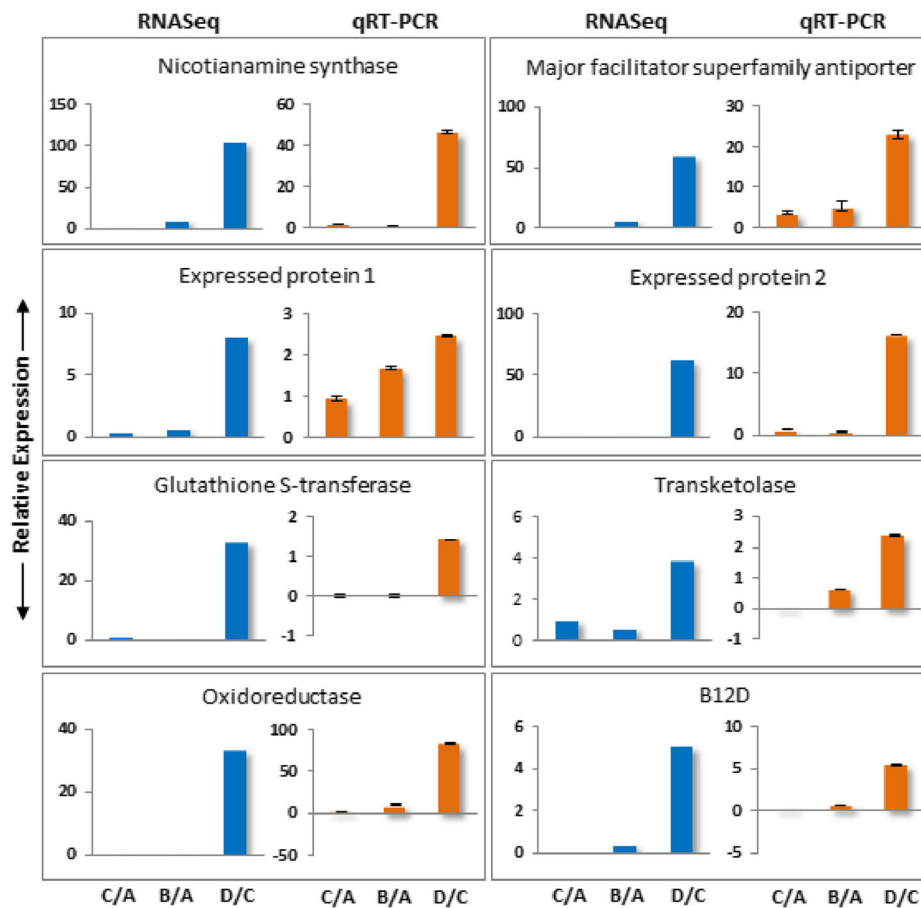


Fig. 9 Confirmation of expression profiles of candidate genes by RT-qPCR. In each box, the panel on the left presents the fold change expression values obtained from RPKM data of RNA-seq analysis, and the right panel represents the relative mRNA expression data from RT-qPCR. The relative expression values in RT-qPCR have been calculated keeping reference gene expression value as 1. The error bars represent the standard error between three biological replicates of each sample. The gene names are given on the top of each graph. Total RNA of root samples obtained from (A) vector control RMh plants; (B) vector control

RMh plants treated with Nod factors; (C) PhL transgenic plants expressing NFRP genes; and (D) PhL transgenic plants treated with Nod factors. Accession numbers of the rice genes—nicotianamine synthase (LOC_Os03g19420.2), major facilitator superfamily antiporter (LOC_Os11g04020.1), expressed protein 1 (LOC_Os02g33070.1), expressed protein 2 (LOC_Os08g05960.1), glutathione S-transferase (LOC_Os10g38340.1), Transketolase (LOC_Os07g09190.1), oxidoreductase (LOC_Os04g27060.1), B12D (LOC_Os07g41350.1)

treatment induced changes in expression patterns of many genes. Among these, a significant number of genes associated with defense/immunity/stress responses (Fig. 7; Supplementary Figs. S5) and synthesis of secondary metabolites (Supplementary Figs. S6-S14) were downregulated, including genes encoding hydrolases, chitinases, and peroxidases (Supplementary Figs. S6 and S9c, d). The results pertaining to NF-mediated downregulation of defense/stress-related genes are in conformity with the results obtained with other monocot plants such as *C₄* maize and *Setaria* (Tanaka et al. 2015). Altogether, these findings demonstrate that non-legume plants including rice not only have inherent ability to recognize NFs but also exhibit transcriptional response to NFs. It is not known whether downregulation of defense-related genetic programs is beneficial for accommodating symbiosis. *Arabidopsis* does not form symbiosis with either

mycorrhizal fungi or rhizobia (Remy et al. 1994), but is able to recognize NFs (Liang et al. 2013). Similar to maize, *Setaria* (Tanaka et al. 2015) and rice (present study), NFs suppress MAMP-triggered immune responses in *Arabidopsis* (Liang et al. 2013). Based on these results, Liang et al. (2013) suggested that suppression of MAMP-triggered immunity by NFs represents a LCO recognition mechanism, which is not associated with processes related to symbiosis.

Impact of Expression of Legume NFRPs on NF Perception in Rice Roots

In the present study, we have found that the expression of legume NFRPs profoundly impacts transcriptional responses in rice roots. The RNA-seq analysis revealed that in NFRP-expressing rice roots, the expression of diverse genes was

downregulated including genes related to microbe-associated molecular pattern (MAMP)–triggered immunity and other defense responses as well as those involved in biosynthesis of secondary metabolites (Fig. 7, Supplementary Figs. S5–S14) and phytohormones (Supplementary Figs. S15 and S16).

However, upon treatment with NFs, the NFRP-expressing PhL plants exhibited profoundly different gene expression patterns in contrast to untreated PhL plants. In general, many genes participating in diverse biological processes were highly upregulated in NF-treated roots. GO and KEGG analysis of DEGs revealed that highly enriched categories of genes belonging to biological processes are particularly related to response to stress (including abiotic, biotic, and defense responses), metabolic processes (including primary and secondary metabolic processes together with pathways for generation of primary precursor metabolites and secondary metabolites), transcriptional regulation, hormonal stimulus, and transport (Fig. 7; Supplementary Figs. S4–S16).

Transient co-expression of MtNFP and MtLYK3 was found to induce cell death in tobacco leaves (Pietraszewska-Bogiel et al. 2013). The induction of cell death due to co-production of MtNFP and MtLYK3 was found to be related to defense-like response, as indicated by compromised membrane permeability and accumulation of phenolic compounds. Likewise, transient co-expression of orthologous LysM-RLKs, LjNFR5, and LjNFR1 from *L. japonicus* also produced similar damaging effects in tobacco leaves as well as in epidermal cell peels of *Allium ampeloprasum* (Madsen et al. 2011). However, results of the present study showed that co-expression of MtNFP and MtLYK3 in rice did not produce such a detrimental effect.

In legumes, addition of NFs to root hairs causes a surge of ROS production within 30 s, and within subsequent few minutes prompt extrusion of ions across cell plasma membrane, resulting in alkalization of medium (Cárdenas et al. 2008; Radutoiu et al. 2003). ROS production and alkalization are also early plant defense responses in MAMP recognition (Zipfel et al. 2006). If such physiological responses are left unchecked by cellular regulatory mechanisms, they have a potential to cause cell death (Madsen et al. 2011). In legume symbiosis, upon NF perception, the LysM-RLKs (MtLYK3-MtNFR or LjNFR1-LjNFR5) also trigger burst of ROS in root hairs and extracellular alkalization, but they are only transiently exhibited. It is possible that these effects are promptly suppressed by symbiosis-specific cellular regulatory components, thus averting cell damage/death. Hence, it was hypothesized that due to the absence of symbiosis-specific regulatory components in tobacco, the LysM-RLKs-mediated signaling are interpreted differently leading to activation of defense response and ultimate cell death (Madsen et al. 2011; Pietraszewska-Bogiel et al. 2013).

In rice, we co-expressed NF receptor-like kinases, MtNFP and MtLYK3, along with their interacting protein,

MtSYMREM1, and another NF receptor LjLNP. Unlike in tobacco, co-expression of MtNFP and MtLYK3 did not cause any detrimental effect in rice. It is not known whether the lack of such a negative effect in rice is due to co-expression of MtNFP and MtLYK3 along with other symbiosis-related components, MtSYMREM1 and LjLNP, or whether rice has inherent mechanism to interpret the LysM-RLKs-mediated signaling differently to avert such cell damage/death. Incidentally, co-expression of these NFRPs resulted in the downregulation of expression of several defense-related genes in rice. Upon treatment with NFs, diverse defense responsive genes were upregulated in the rice roots expressing the legume NFRPs. Even such an upregulation of defense response genes did not cause any visible damage in rice plants, excepting some loss in pollen viability. In legume-*Rhizobium* symbiosis, a number of genes involved in the defense response against pathogen are abundantly induced during initial stages of rhizobial infection, but their expression was quickly repressed during subsequent phases of nodule development (Kouchi et al. 2004).

Expression of Legume-Specific NFRPs Hypersensitizes Rice Roots and Primes Root Hairs to Respond to NFs

In legumes, NF treatment induces root hair deformation. This morphological change occurs due to reactivation of polar growth in root hairs resulting in branching, curling, etc. (Larrainzar et al. 2015). Root hair curl (the shepherd's crook) creates a niche for entrapment of rhizobia to enable bacterial cells to initiate infection thread formation. Earlier studies with more than 50 rice varieties including some wild species of rice demonstrated that unlike in legumes, rice lacks the ability to respond to rhizobial NFs in terms of exhibiting any morphological changes in root hairs (PM Reddy and JK Ladha, unpublished). Present study showed that the expression of legume NFRPs enables rice root hairs to efficiently respond to NFs (Fig. 5). Elicitation of root hair deformation in NFRP-expressing PhL plants in response to NFs indicates that the legume NFRPs are able to function normally in rice cellular milieu to enable perception and transmission of Nod signal appropriately to trigger phenotypic changes in root hairs.

Influence of Legume NFRP Expression on Colonization of Rice Roots by Rhizobia

Results of the current study showed that colonization of rhizobia on root surface as well as at the sites of lateral root emergence was lower in rice plants expressing legume NFRPs as compared with vector control RMh plants (compare Fig. 3d with b). It may be relevant to mention here that *Rhizobium* NGR234 strain used in these studies carried hybrid *nodD* (flavonoid-independent transcriptional activator, FITA) gene, which is capable of inducing NF production independently of

flavonoids (Spaink et al. 1989). Our study with the RNA-seq analysis of PhL roots clearly evidenced that the constitutive expression of legume NFRPs make rice roots hypersensitive to NFs, prompting massive upregulation of diverse genes associated with defense response. Thus, it is tempting to speculate that reduction in density of rhizobial colonization in the roots of NFRP-expressing PhL plants may be a direct consequence of NF-activated plant defense, which likely hinders bacterial growth. However, it should be emphasized here that in case of legume roots, when inoculated with rhizobia, expression of several defense-related genes in roots are transiently upregulated, but at later stages, their expression subsides, paving way for bacterial infection and development of symbiosis (Gourion et al. 2015; Larrainzar et al. 2015). It will be interesting to study if such a phenomenon occurs in PhL plants (rice plants expressing NFRPs) as well when inoculated with rhizobia.

To the best of our knowledge, no information is available on dynamics of gene expression in legumes exposed to purified NFs/LCOs for prolonged durations (beyond 48 h; Wang et al. 2012). In soybean, LCO (NodBj-V (C18:1, MeFuc) foliar spray promoted expression of various stress resistance genes, especially those involved in defense, cold, oxidative stress, and phosphate deficiency (Lindsay 2007; Wang et al. 2012). In current study with PhL rice plants expressing NFRPs, 24-h NF treatment resulted in drastic upregulation of defense-related genes in roots. In order to verify if NF effect on upregulation of defense genes is transitory, as is the case with legume roots inoculated with rhizobia (in legumes, defense responses gradually wane off beyond 48 h after rhizobial inoculation, e.g., Cook et al. 1995), gene expression studies need to be performed with longer incubation periods with NFs. However, it will be difficult to undertake such studies as NFs are gradually degraded and their concentration tapers off due to the activity of hydrolases/chitinases in root environment. Under such circumstances, it will be challenging to interpret if apparent waning of defense-related gene expression (if any) is due to lowering of concentration of NFs as a consequence of degradation, or is it really because of inherent plasticity of plants to re-calibrate gene expression to original levels after initial surge in gene expression.

Expression of NFRPs Modulates Hormone Biosynthetic Pathways in PhL Rice Roots

Phytohormones such as salicylic acid, jasmonic acid, ethylene, abscisic acid, and brassinosteroids have been implicated in playing positive role in conferring immunity in rice, while auxins and gibberellins were shown to function as negative regulators (Yang et al. 2013).

Analysis of transcriptional profiles of NFRP-expressing rice roots indicated that several genes associated with hormone biosynthetic pathways (except gibberellins) are

downregulated relative to the expression in vector control RMh plants (Supplementary Figs. S15 and S16). But, intriguingly, NF treatment of the same NFRP-expressing plants highly upregulated the expression of brassinosteroid, jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene biosynthetic pathway genes including those associated with auxin and gibberellin biosynthesis. Future studies can only answer if NF-activated biosynthesis of hormones in turn helps regulate immunity-related genetic circuits in rice plants.

Rice Native Receptors and the Legume NF Receptors Activate Divergent Nod Signaling Cascades in Rice Roots

Both vector control RMh plants and PhL plants expressing the legume NFRPs perceive NFs, but set off vastly divergent gene expression patterns. Upon perception of NFs, expression of several defense/stress response genes was suppressed/downregulated in vector control RMh plants, while in PhL plants expressing the legume NFRPs, expression of entirely a divergent set of defense/stress response genes was activated/upregulated. These results suggest that the “native receptors” of rice and the “NF receptors” of legumes interpret Nod signal differently and activate distinct signaling cascades leading to disparate gene expression patterns in rice roots.

Conclusion

A long-cherished goal of legume-rhizobia symbiosis research is to extend this symbiotic nitrogen-fixing capacity to cereal plants such as rice to render them independent of synthetic N fertilizers. As a part of achieving this ultimate goal, in this work, initially, we expressed three legume-specific nodulation (Nod) factor receptor protein genes in rice and assessed their impact on Nod factor (NF) perception and consequently triggered biological responses in roots. In the current study, we report for the first time that the expression of legume Nod factor receptor proteins rendered rice roots hypersensitive to rhizobial NFs and conferred root hairs the ability to respond to NFs in terms of exhibiting deformations, albeit at lower levels, reminiscent of legume initial symbiotic reactions. Moreover, the study demonstrated that the legume-specific NF receptors transmit Nod signal differently, activating distinct signaling pathways in rice roots. This study forms a foundation for adding on additional genetic circuits needed for the development of rhizobial symbiosis in rice.

Acknowledgments We are grateful to Dr. PHD Schünmann (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia) for his kind gift of pUbi.tn1 and pWAct.GUS vectors, Dr. T Tzfira (University of Michigan, Ann Arbor, USA) for donating pSAT-RCS2-Hpt modular vector system, Dr. DJ Gage (University of Connecticut, Storrs, USA) for gifting pDG77, Dr. Luis Cárdenas (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma

de México) for pMP604, and Dr. WJ Broughton and Dr. X Perret (LBMPS, Université de Geneve, Switzerland) for providing *Rhizobium* NGR234- Ω -nodD2 and *S. rhizobium* (pA28) strains. We thank Biol. Olivia Santana and Dr. Luis Cárdenas (Instituto de Biotecnología, UNAM) for advice in purification of Nod factors, Ms. Anjulata Singh (The Energy and Resources Institute, New Delhi) for the help in determining the orientations of gene expression cassettes in pPhL vector, and Dr. Jesús Arellano for guidance in particle bombardment of rice calli. This work is part of the doctoral thesis of Altízar-Molina A. in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, and she gratefully acknowledges the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for fellowship (204969).

Author Contributions AA-M performed experiments and wrote manuscript. LL carried out bioinformatic analysis. MO-B, MR, SS, and SD-R contributed in primer designing and quantitative RT-PCR experiments. LM, MLV-H, and SS-K performed Southern blot analyses. NM performed statistical analysis. GH critically reviewed the article and provided inputs. PMR conceptualized and planned the project and vector construction and contributed to manuscript writing.

Funding Information Financial support for the project was provided by CONACyT-Mexico (128135), DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN206208) and DBT, India (BT/PR13634/AGIII/103/897/2015) to PM Reddy.

Data Availability All data generated from this investigation are included in the main text of the manuscript and in the Supplementary Files. The complete RNA-seq data have been deposited in NCBI's Bioproject under identifiers PRJNA545468, GSE131964 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=GSE131964>).

Compliance with Ethical Standards

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

References

Africare, Oxfam A (2010) More rice for people, more water for the planet. WWF-ICRISAT Project, Hyderabad

Alexa A, Rahnenführer J (2016) TopGO: enrichment analysis for gene ontology. R package version 2.26.0. Open-source Bioconductor R pipeline. <https://bioconductor.riken.jp/packages/3.4/bioc/html/topGO.html>

Arrighi JF, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Gherardi M, Huguet T, Geurts R, Denarie J, Rouge P, Gough C (2006) The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142:265–279. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084657>

Atti S, Bonnell R, Prasher S, Smith DL (2005) Response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling. *Irrig Drain* 54:15–30. <https://doi.org/10.1002/ird.153>

Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H (2008) Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CcAMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol* 49:1659–1671. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn153>

Beatty PH, Good AG (2011) Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science* 333:416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>

Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of the lipochitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* 29:453–464. <https://doi.org/10.1007/BF00020977>

Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F, Quinto C (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J* 56:802–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03644.x>

Chen C, Gao M, Liu J, Zhu H (2007) Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 145:1619–1628. <https://doi.org/10.1104/pp.107.109876>

Chen C, Ane J-M, Zhu H (2008) OsIPD3, an ortholog of the *Medicago truncatula* DMI3 interacting protein IPD3, is required for mycorrhizal symbiosis in rice. *New Phytol* 180:311–315. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02612.x>

Chen C, Fan C, Gao M, Zhu H (2009) Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol* 149:306–317. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131540>

Chung S-M, Frankman EL, Tzfira T (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 10:357–361. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.001>

Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, Vanden Bosch K (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7:43–55

Crawley MJ (1993) GLIM for ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford

De Jong AJ, Heidstra R, Spaink HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T, Schiavo FL, Terzi M, Bisseling T, Van Kammen A, De Vries SC (1993) Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* 5:615–620. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.6.615>

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Report* 1:19–21

Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>

Duzan HM, Mabood F, Zhou X, Souleimanov A, Smith DL (2005) Nod factor induces soybean resistance to powdery mildew. *Plant Physiol Biochem* 43:1022–1030. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.08.004>

Gage DJ (2002) Analysis of infection thread development using GFP- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184:7042–7046. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.7042-7046.2002>

Goderis IJWM, De Bolle MFC, Francois IEJA, Wouters PFJ, Broekaert WF, Cammue BPA (2002) A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Mol Biol* 50:17–27. <https://doi.org/10.1023/A:1016052416053>

Goedhart J, Hink MA, Visser AJ, Bisseling T, Gadella TW (2000) In vivo fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls. *Plant J* 21:109–119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00656.x>

Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G (2015) Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* 20:186–194. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>

Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, Hirochika H, Imaizumi-Anraku H, Paszkowski U (2008) Arbuscular mycorrhizal-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20:2989–3005. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062414>

Hernández G, Ramirez M, Valdes-Lopez O, Tesfaye M, Graham MA, Czechowski T, Schlereth A, Wandrey M, Erban A, Cheung F, Wu

- HC, Lara M, Town CD, Kopka J, Udvardi MK, Vance CP (2007) Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol* 144:752–767. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096958>
- Jose AJ, Zhou X, Souleimanov A, Smith D (2007) Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. *J Plant Physiol* 164:1391–1393. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.12.007>
- Khan WM, Prithiviraj B, Smith DL (2002) Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica* 40:621–624. <https://doi.org/10.1023/A:1024320606812>
- Khan W, Costa C, Souleimanov A, Prithiviraj B, Smith DL (2011) Response of *Arabidopsis thaliana* roots to lipo-chitoooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum* and other chitin-like compounds. *Plant Growth Regul* 63:243–249. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9521-6>
- Kidaj D, Wielbo J, Skorupska A (2012) Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiol Res* 167:144–150. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.001>
- Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu G-J, Kumagai H, Tajima S, Suganuma N, Suzuki A, Aoki T, Hayashi M, Yokoyama T, Ohyama T, Asamizu E, Kuwata C, Shibata D, Tabata S (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 11:263–274. <https://doi.org/10.1093/dnares/11.4.263>
- Ladha JK, Reddy PM (1995) Extension of nitrogen fixation to rice—necessity and possibilities. *GeoJournal* 35:363–372. <https://doi.org/10.1007/BF00989144>
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Larrainzar E, Riely BK, Kim SC, Carrasquilla-Garcia N, Yu H-J, Hwang H-J, Oh M, Kim GB, Surendrarao AK, Chasman D, Siahpirani AF, Penmetsa RV, Lee G-S, Kim N, Roy S, Mun J-H, Cook DR (2015) Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant Physiol* 169:233–265. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Herve C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray JD, Udvardi MK, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T (2010) A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2343–2348. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913320107>
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, Kang C, Qiu J, Stacey G (2013) Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* 341:1384–1387. <https://doi.org/10.1126/science.1242736>
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science* 302:630–633. <https://doi.org/10.1126/science.1090074>
- Lindsay J (2007) The effect of lipo-chitoooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum*, on soybean salicylic acid, pathogenesis-related protein activity and gene expression. M Sc Thesis, McGill University
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Long SR (1996) Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8:1885–1898. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1885>
- Lopez-Lara IM, van den Berg JDJ, Thomas-Oates JE, Glushka J, Lugtenberg BJJ, Spink HP (1995) Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol Microbiol* 15:627–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02372.x>
- Madsen EB, Antolin-Llovera M, Grossmann C, Ye J, Vieweg S, Broghammer A, Krusell L, Radutoiu S, Jensen ON, Stougaard J, Parniske M (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* 65:404–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04431.x>
- Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Forney D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Becard G, Denarie J (2011) Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58–63. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Markmann K, Parniske M (2009) Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends Plant Sci* 14:77–86. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.009>
- Miransari M, Smith D (2009) Rhizobial lipo-chitoooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnol* 8:270–275. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.270.275>
- Miransari M, Balakrishnan P, Smith D, Mackenzie AF, Bahrami HA, Malakouti MJ, Rejali F (2006) Overcoming the stressful effect of low pH on soybean root hair curling using lipochitoooligosaccharides. *Commun Soil Sci Plant Anal* 37:1103–1110. <https://doi.org/10.1080/00103620600586391>
- Miyata K, Kozaki T, Kouzai Y, Ozawa K, Ishii K, Asamizu E, Okabe Y, Umehara Y, Miyamoto A, Kobae Y, Akiyama K, Kaku H, Nishizawa Y, Shibuya N, Nakagawa T (2014) The bifunctional plant receptor, *OsCERK1*, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol* 55:1864–1872. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu129>
- Miyata K, Hayafune M, Kobae Y, Kaku H, Nishizawa Y, Masuda Y, Shibuya N, Nakagawa T (2016) Evaluation of the role of the LysM receptor-like kinase, *OsNFR5/OsRLK2* for AM symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol* 57:2283–2290. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw144>
- Narsai R, Ivanova A, Ng S, Whelan J (2010) Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. *BMC Plant Biol* 10:56. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-56>
- Olah B, Briere C, Becard G, Denarie J, Gough C (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J* 44:195–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x>
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263. <https://doi.org/10.1038/nmicro2990>
- Oldroyd GED, 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>
- Ortiz-Berrocal M, Lozano L, Sanchez-Flores A, Nava N, Hernández G, Reddy PM (2017) Expression in rice of an autoactive variant of *Medicago truncatula* DMI3, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from the common symbiotic pathway modifies root transcriptome and improves mycorrhizal colonization. *Plant Biotechnol Rep* 11:271–287. <https://doi.org/10.1007/s11816-017-0449-4>
- Pietraszewska-Bogiel A, Lefebvre B, Koini MA, Klaus-Heisen D, Takken FLW, Geurts R, Cullimore JV, Gadella TWJ (2013) Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, *NFP* and *LYK3*, produced in *Nicotiana benthamiana* induces

- defence-like responses. *PLoS One* 8:e65055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065055>
- Prithiviraj B, Zhou X, Souleimanov A, Kahn W, Smith D (2003) A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta* 216:437–445. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0928-9>
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425:585–592. <https://doi.org/10.1038/nature02039>
- Ramírez M, Guillen G, Fuentes SI, Iniguez LP, Aparicio-Fabre R, Zamorano-Sanchez D, Encarnacion-Guevara S, Panzeri D, Castiglioni B, Cremonesi P, Strozzi F, Stella A, Girard L, Sparvoli F, Hernández G (2013) Transcript profiling of common bean nodules subjected to oxidative stress. *Physiol Plant* 149:389–407. <https://doi.org/10.1111/pp1.12040>
- Reddy PM, Ladha JK, Ramos MC, Maillet F, Hernandez RJ, Torrizo LB, Oliva NP, Datta SK, Datta K (1998) Rhizobial lipochitooligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulin gene *ENOD12* in rice. *Plant J* 14:693–702. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00170.x>
- Reddy PM, Altúzar-Molina AR, Ortiz-Berrocal M, Medina-Andrés R, López-Sámamo M, Martínez-Aguilar L, Velázquez-Hernández MDL (2013) Predisposition and redesigning of genetic networks of rice for accommodating nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. In: Muralidharan K, Siddiq EA (eds) *International Dialogue on Perception and Prospects of Designer Rice*. Society for Advancement of Rice Research, Directorate of Rice Research, Hyderabad 500030, India, pp 245–257
- Relić B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé JC, Broughton WJ (1993) Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors on *Macropitilium atropurpureum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:764–774. <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-764>
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11841–11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25>
- Roberts NJ, Brigham J, Wu B, Murphy JB, Volpin H, Phillips DA, Etzler ME (1999) A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. *Mol Gen Genet* 262:261–267. <https://doi.org/10.1007/s004380051082>
- Rogers C, Oldroyd GED (2014) Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot* 65:1939–1946. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru098>
- Rohrig H, Schmidt J, Walden R, Czaja I, Miklacevics E, Wieneke U, Schell J, John M (1995) Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-chitooligosaccharides. *Science* 269:841–843. <https://doi.org/10.1126/science.269.5225.841>
- Schünmann PHD, Llewellyn DJ, Surin B, Boevink P, Feyter RCD, Waterhouse PM (2003) A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. *Funct Plant Biol* 30:443–452. <https://doi.org/10.1071/FP02166>
- Schwinghamer T, Souleimanov A, Dutilleul P, Smith D (2015) The plant growth regulator lipo-chitooligosaccharide (LCO) enhances the germination of canola (*Brassica napus* [L.]). *J Plant Growth Regul* 34:183–195. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9456-7>
- Souleimanov A, Prithiviraj B, Smith DL (2002) The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J Exp Bot* 53:1929–1934. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf034>
- Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Tak T, Goosen-de Roo L, Pees E, van Brussel AA, Lugtenberg BJJ (1989) Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid nodD product. *J Bacteriol* 171:4045–4053. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.4045-4053>
- Spaink HP, Sheeley DM, van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ (1991) A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354:125–130. <https://doi.org/10.1038/354125a0>
- Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, So RB, Sullia SB, Stacey G, Ladha JK, Reddy PM (2005) Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs2* promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Sci* 169:726–736. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.024>
- Summerfield RJ, Minchin FR, Stewart KA, Ndunguru BJ (1978) Growth, reproductive development and yield of effectively nodulated cowpea plants in contrasting aerial environments. *Ann Appl Biol* 90:277–291. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb02636.x>
- Sun J, Miller JB, Granqvist E, Wiley-Kalil A, Gobbato E, Maillet F, Cottaz S, Samain E, Venkateshwaran M, Fort S, Morris RJ, Ane J-M, Denarie J, Oldroyd GED (2015) Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell* 27:823–838. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131326>
- Tanabe M, Kanehisa M (2012) Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinformatics* 38:1.12.11–11.12.43. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0112s38>
- Tanaka K, Cho S-H, Lee H, Pham AQ, Batek JM, Cui S, Qiu J, Khan SM, Joshi T, Zhang ZJ, Xu D, Stacey G (2015) Effect of lipo-chitooligosaccharide on early growth of C4 grass seedlings. *J Exp Bot* 66:5727–5738. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv260>
- Tarazona S, Furio-Tari P, Turra D, Pietro AD, Nueda MJ, Conesa A, Ferrer A (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* 43:e140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv711>
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J* 47:969–976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02836.x>
- Wang M-B, Waterhouse PM (2000) High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is dependent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43:67–82. <https://doi.org/10.1023/A:1006490331303>
- Wang N, Khan W, Smith DL (2012) Changes in soybean global gene expression after application of Lipo-chitooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum* under sub-optimal temperature. *PLoS One* 7:e31571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031571>
- Xu Y, Buchholz WG, DeRose RT, Hall TC (1995) Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. *Plant Mol Biol* 27:237–248. <https://doi.org/10.1007/BF00020180>
- Yang D-L, Yang Y, Hea Z (2013) Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol Plant* 6:675–685. <https://doi.org/10.1093/mp/sst056>
- Yano K, Yoshida S, Muller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci* 105:20540–20545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806858105>
- Yoshida S, Fomo DA, Cock JH (1976) *Laboratory manual for physiological studies of rice*. International Rice Research Institute, Los Baños
- Zhang X, Dong W, Sun J, Feng F, Deng Y, He Z, Oldroyd GED, Wang E (2015) The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *Plant J* 81:258–267. <https://doi.org/10.1111/tpj.12723>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>

Supplementary information

(Figures and Tables)

Expression of the legume-specific Nod factor receptor proteins alters developmental and immune responses in rice

Alma Altúzar-Molina^{1‡}, Luis Lozano¹, Marlene Ortíz-Berrocal¹, Mario Ramírez¹, Lourdes Martínez¹, María de Lourdes Velázquez-Hernández¹², Swatishmita Dhar-Ray³, Sonia Silvente¹⁴, Néstor Mariano⁴, Svetlana Shishkova⁵, Georgina Hernández¹, Pallavolu M. Reddy^{13}*

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, México, ²Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, Michoacán, México, ³The Energy and Resources Institute, India Habitat Centre, Lodi Road, New Delhi 110003, India, ⁴Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito, Chilecito, La Rioja F5360CKB, Argentina, ⁵Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México

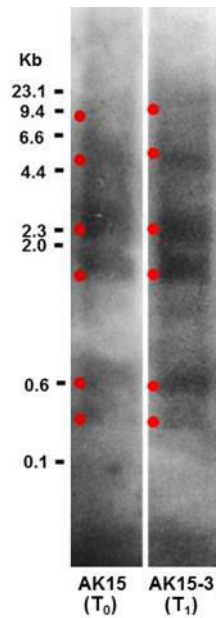


Figure S1. Determination of copy number of transgenes in PhL (originally designated as AK15) plants. Copy number of transgenes in PhL plants was determined by Southern blot analysis. Genomic DNA of transgenic plants was digested with BamH1, electrophoresed / separated on agarose gel, transferred on to nitrocellulose membrane and probed using DIG-labeled *NFP*.

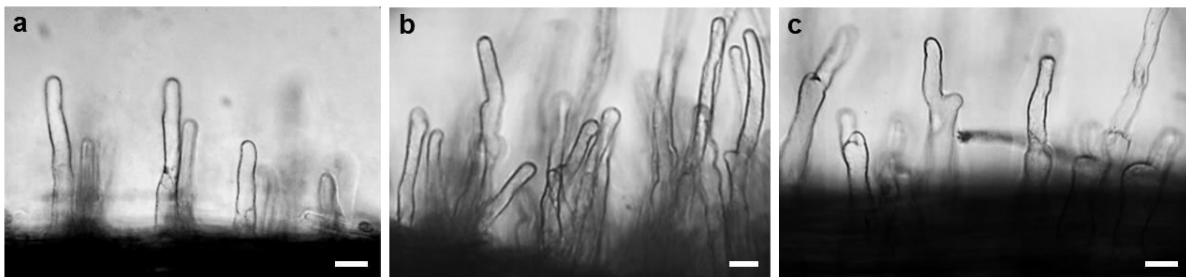


Figure S2. Validation of purified Nod factors on induction of root hair deformation in *Medicago sativa*. Root hairs treated with (a) 0.001% CHAPS, (b) 10^{-9} M Nod factors of *S. meliloti* and (c) 10^{-9} M Nod factors of *Rhizobium* NGR234, for 24 h.

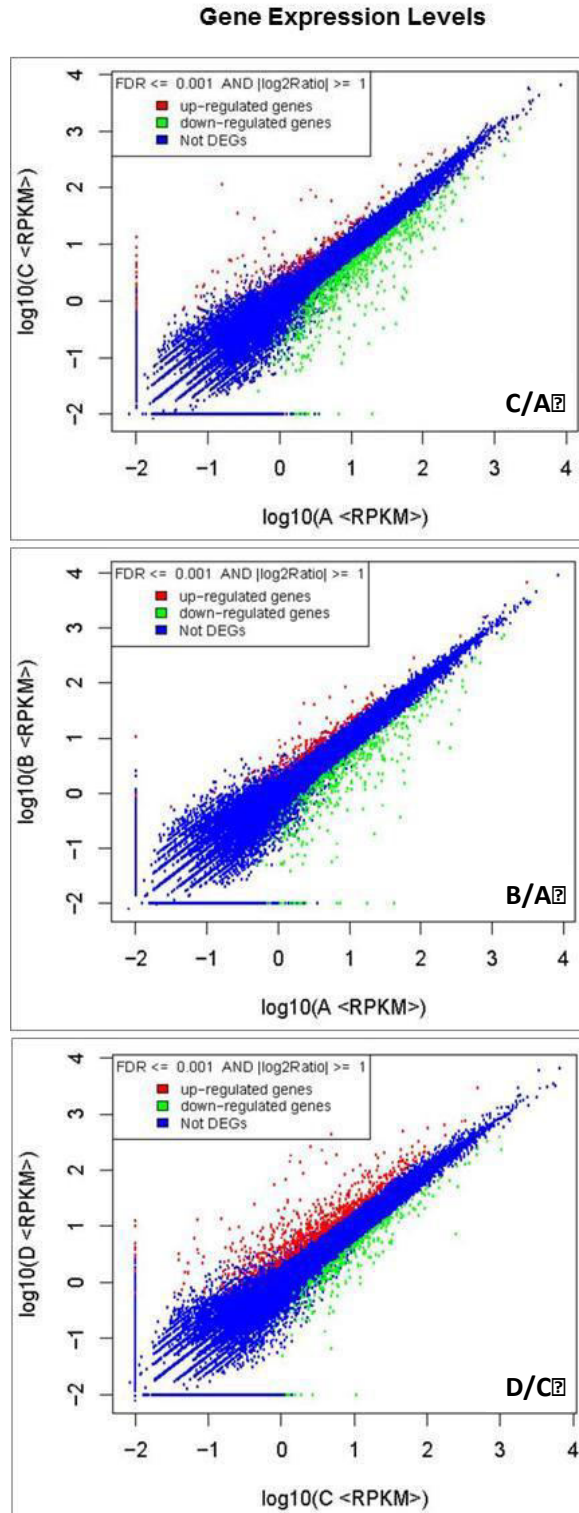


Figure S3. Scatter plots depicting expression of 37309 genes in roots of vector control RMh and Nod factor receptor protein expressing PhL plants treated with or without Nod factors. A - RMh untreated, B - RMh treated with NFs, C - PhL untreated and D - PhL treated with NFs.

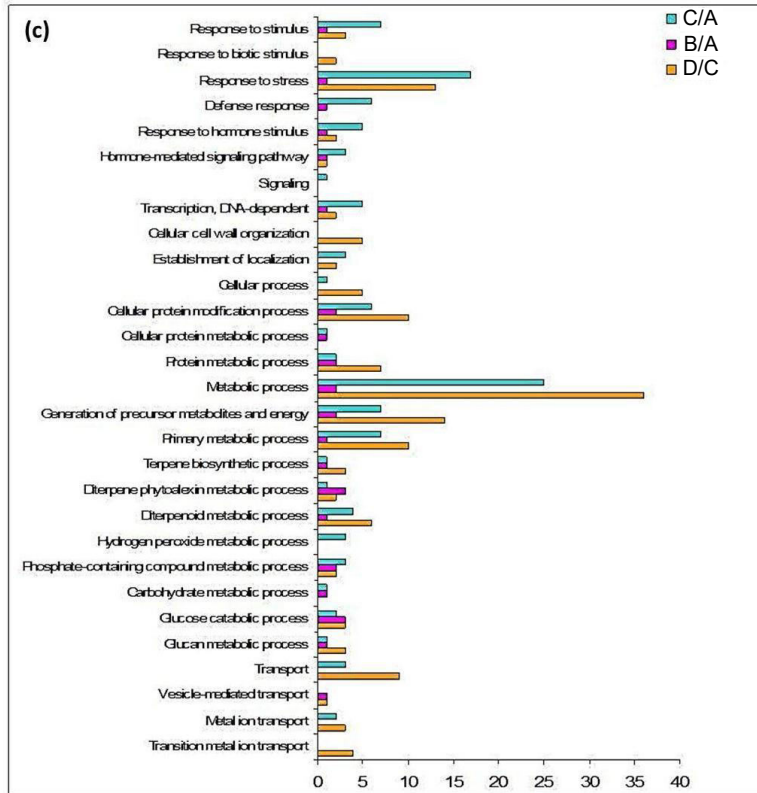
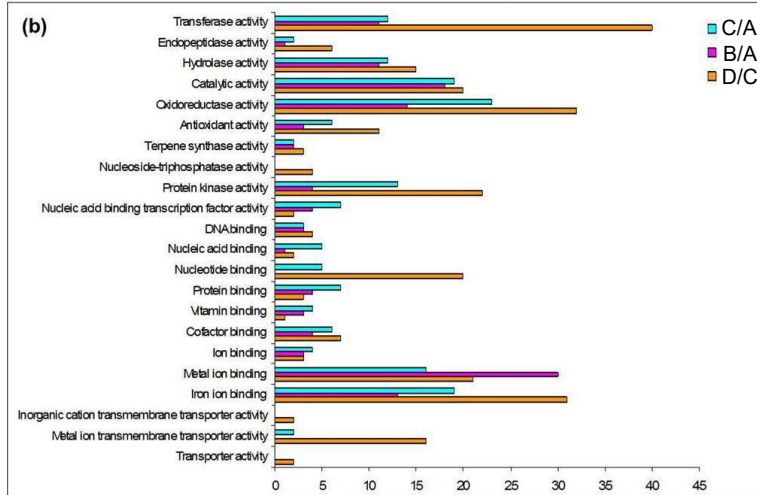
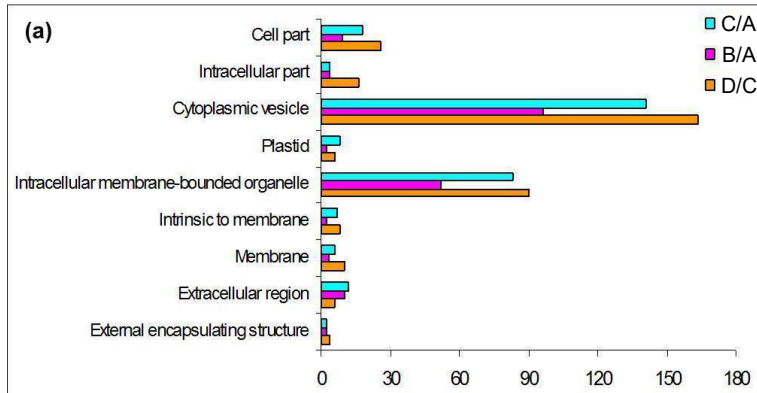


Figure S4. GO based functional annotation of differentially expressed genes in roots of RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. The three GO domains – (a) cellular components, (b) molecular function and (c) biological processes, – are shown for three comparisons: (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants.

of DEGs (Log₂ratio ≥ 1.5)

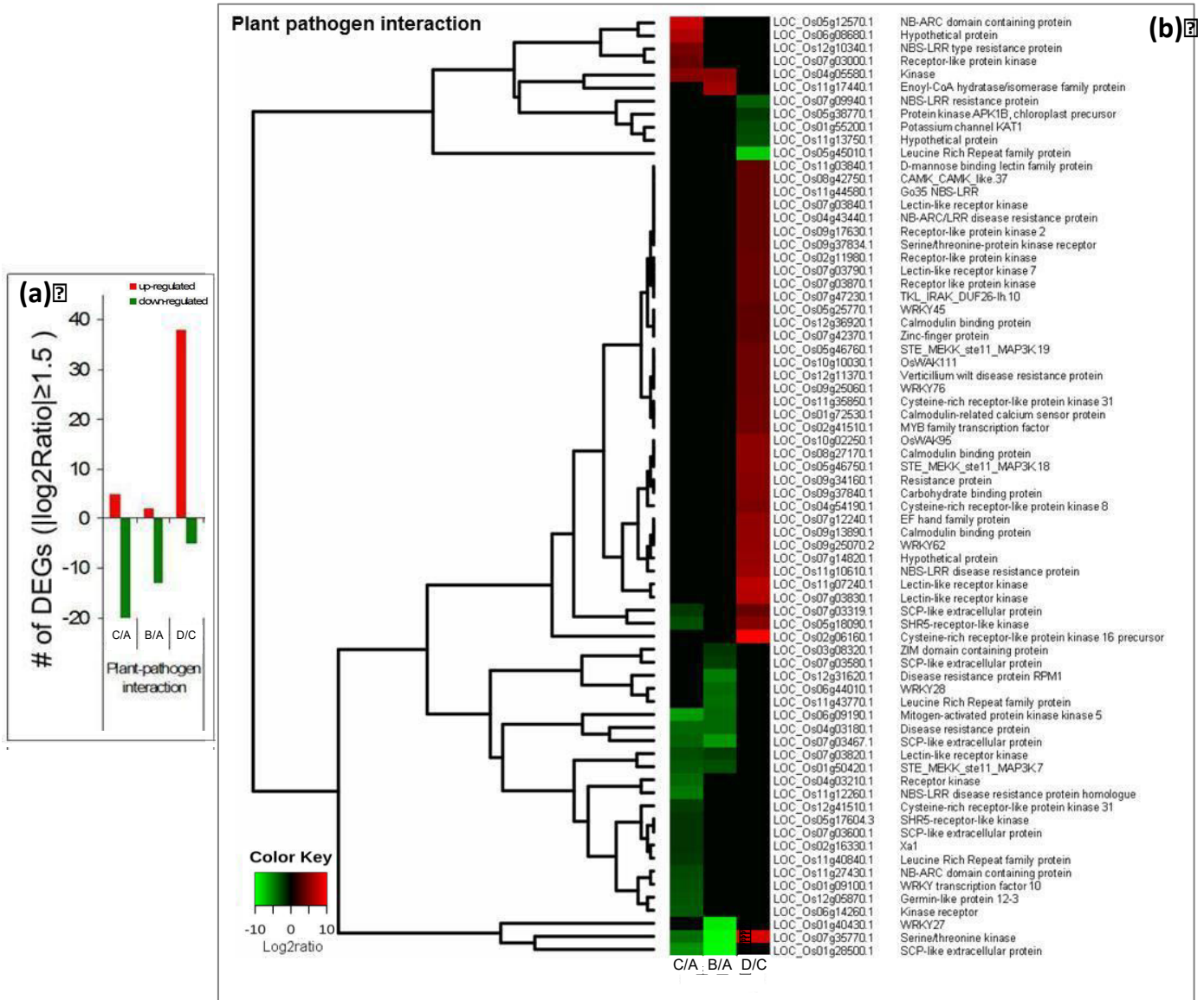


Figure S5. Differentially expressed genes associated with plant pathogen interaction in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (a) KEGG analysis depicting the total number of differentially expressed genes and (b) Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes associated with plant pathogen interaction in roots of RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmap is supplemented with a color coded scale bar depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

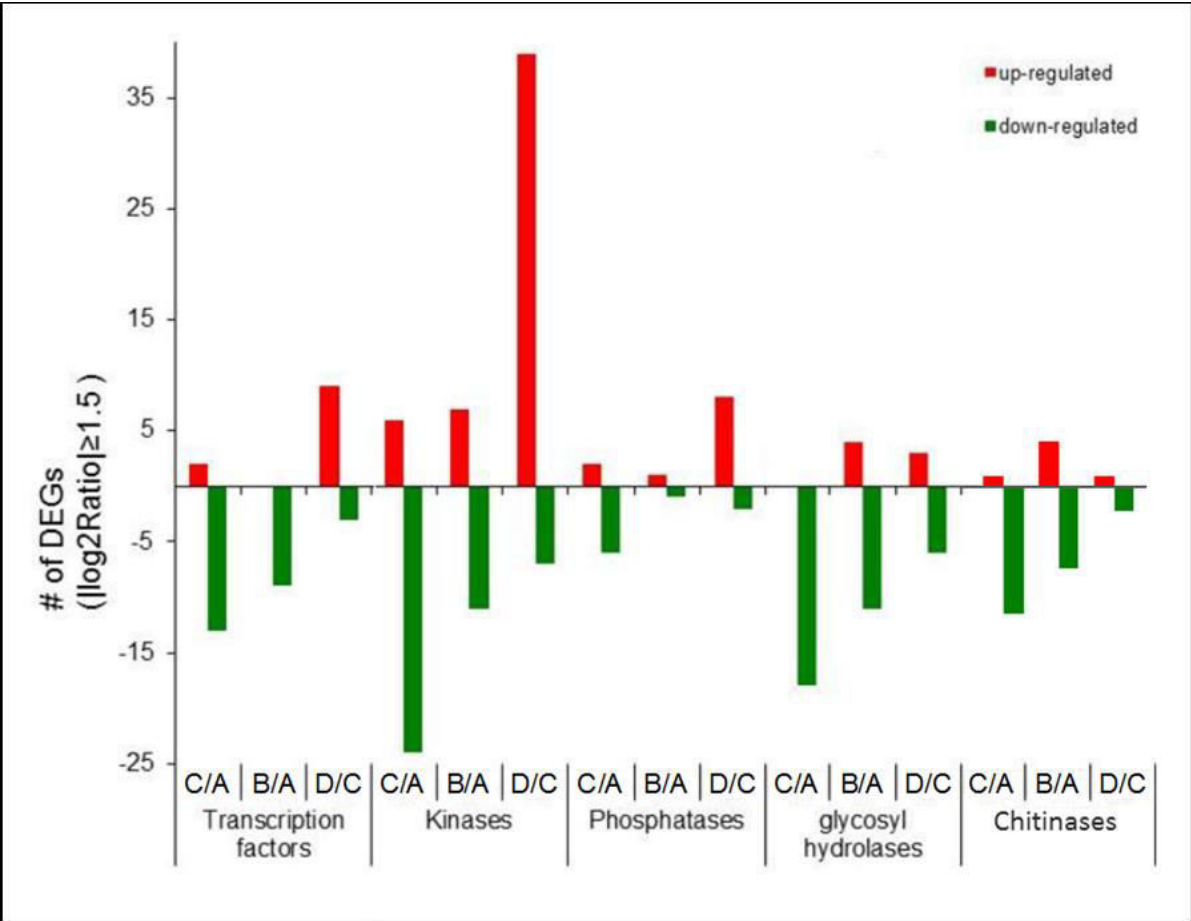


Figure S6. KEGG analysis of differentially expressed transcription factor, kinase, phosphatase, hydrolase and chitinase genes in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants.

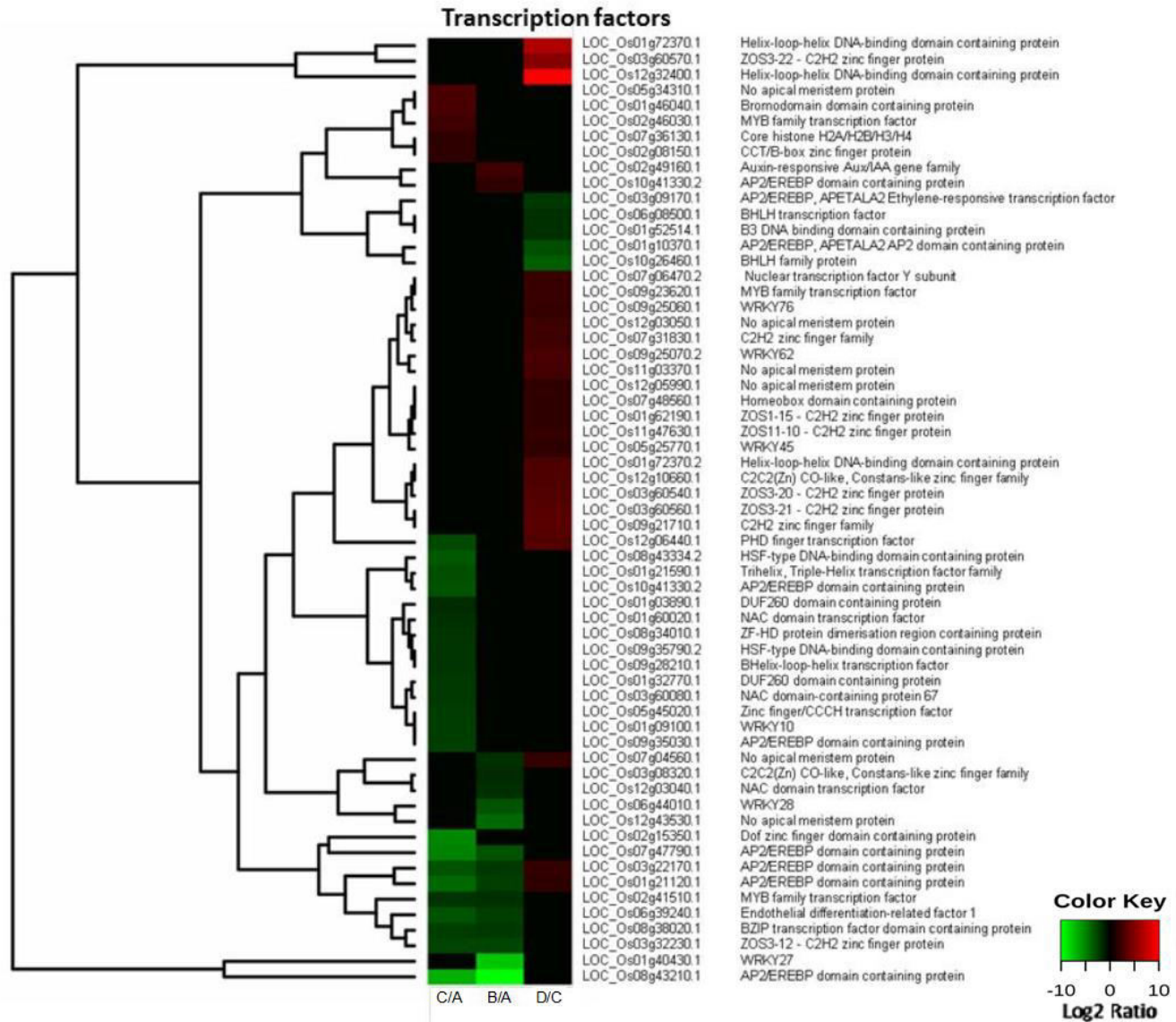


Figure S7. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed transcription factor genes in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmap is supplemented with a color coded scale bar depicting the relative expression levels of genes in log2 scale.

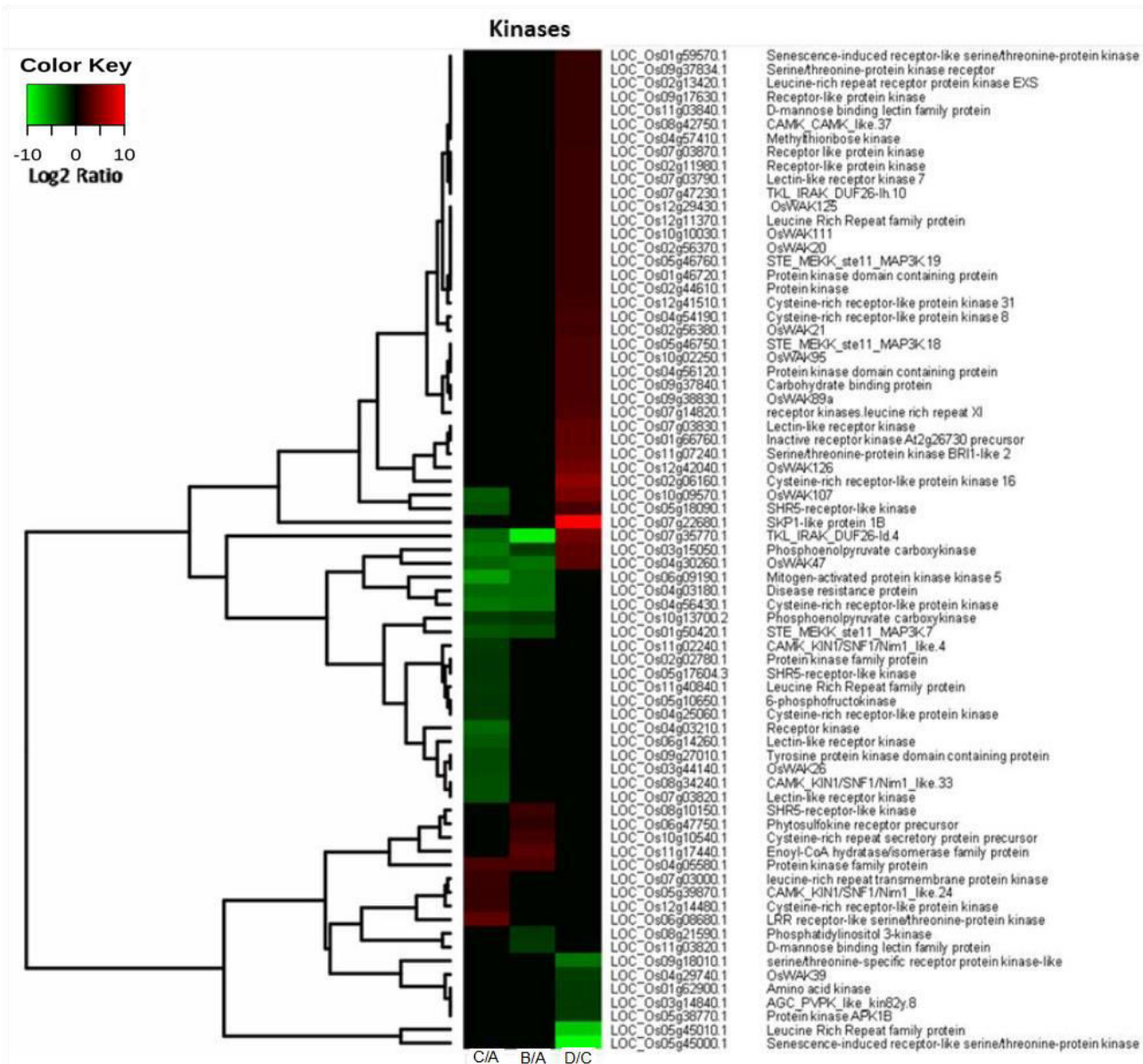


Figure S8. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed kinase genes in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmap is supplemented with a color coded scale bar depicting the relative expression levels of genes in log2 scale.

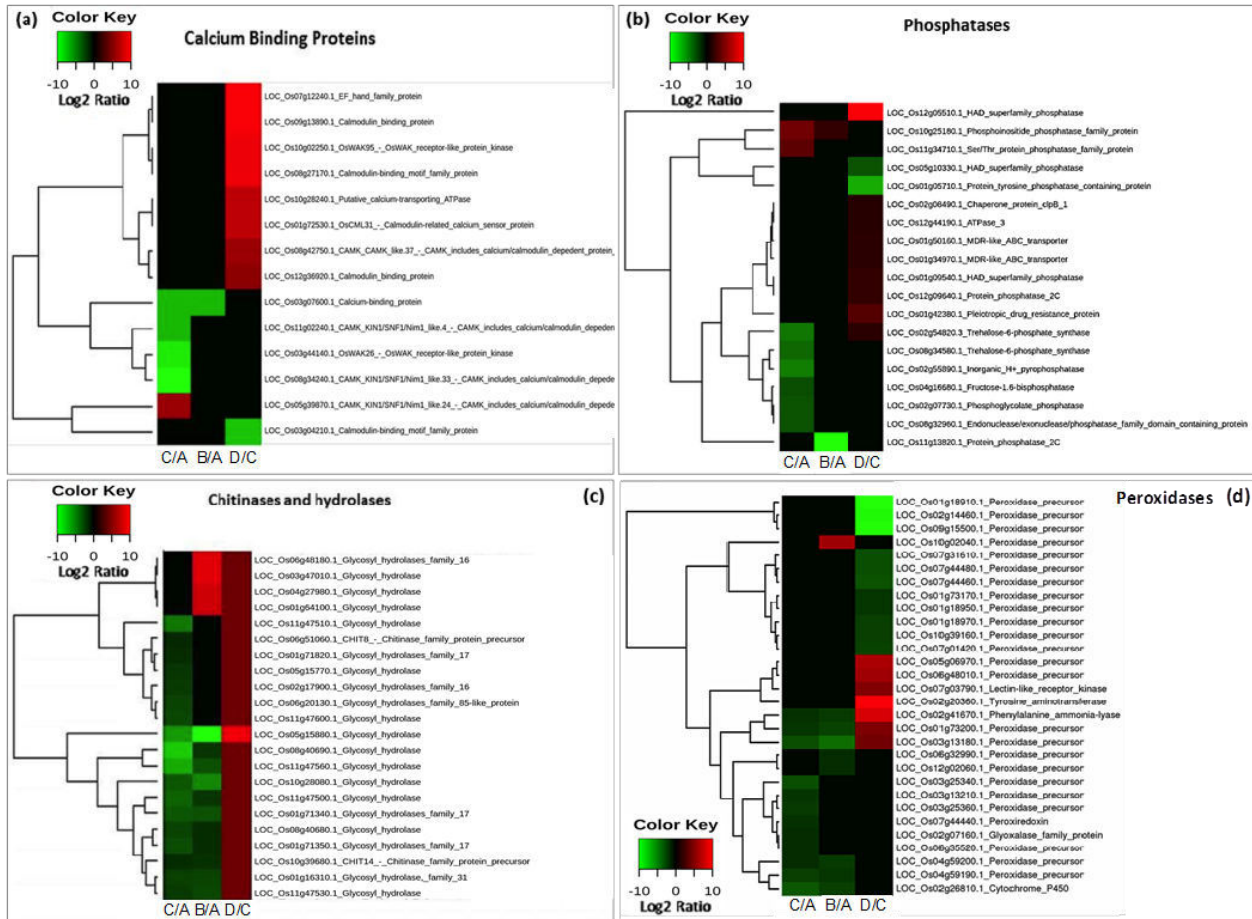


Figure S9. Heatmaps of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes associated with the synthesis of (a) calcium binding proteins, (b) phosphatases, (c) chitinases and hydrolases, and (d) peroxidases in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmaps are supplemented with color coded scale bars depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

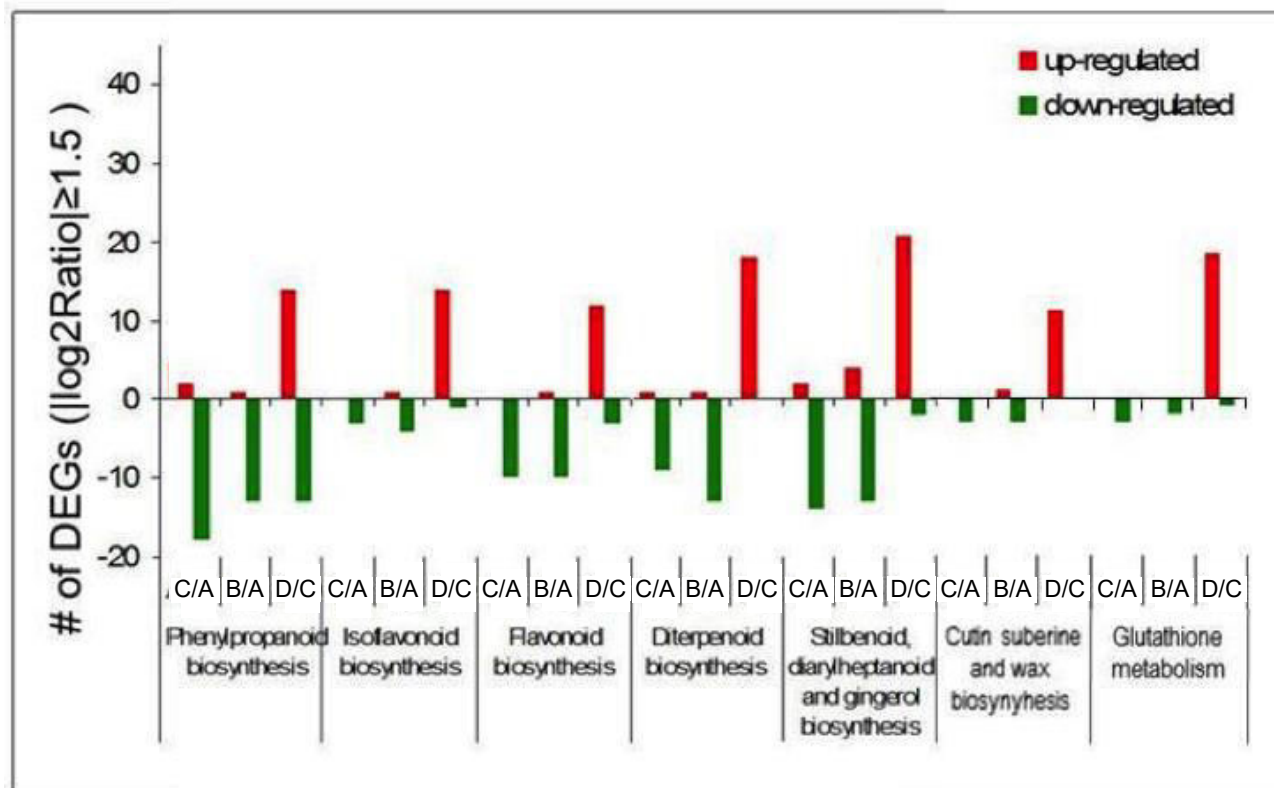


Figure S10. KEGG analysis of differentially expressed genes associated with phenylpropanoid, isoflavonoid, flavonoid, stilbenoid, diarylheptanoid, gingerol, cutin, suberine, wax biosynthesis pathways and glutathione metabolism in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants.

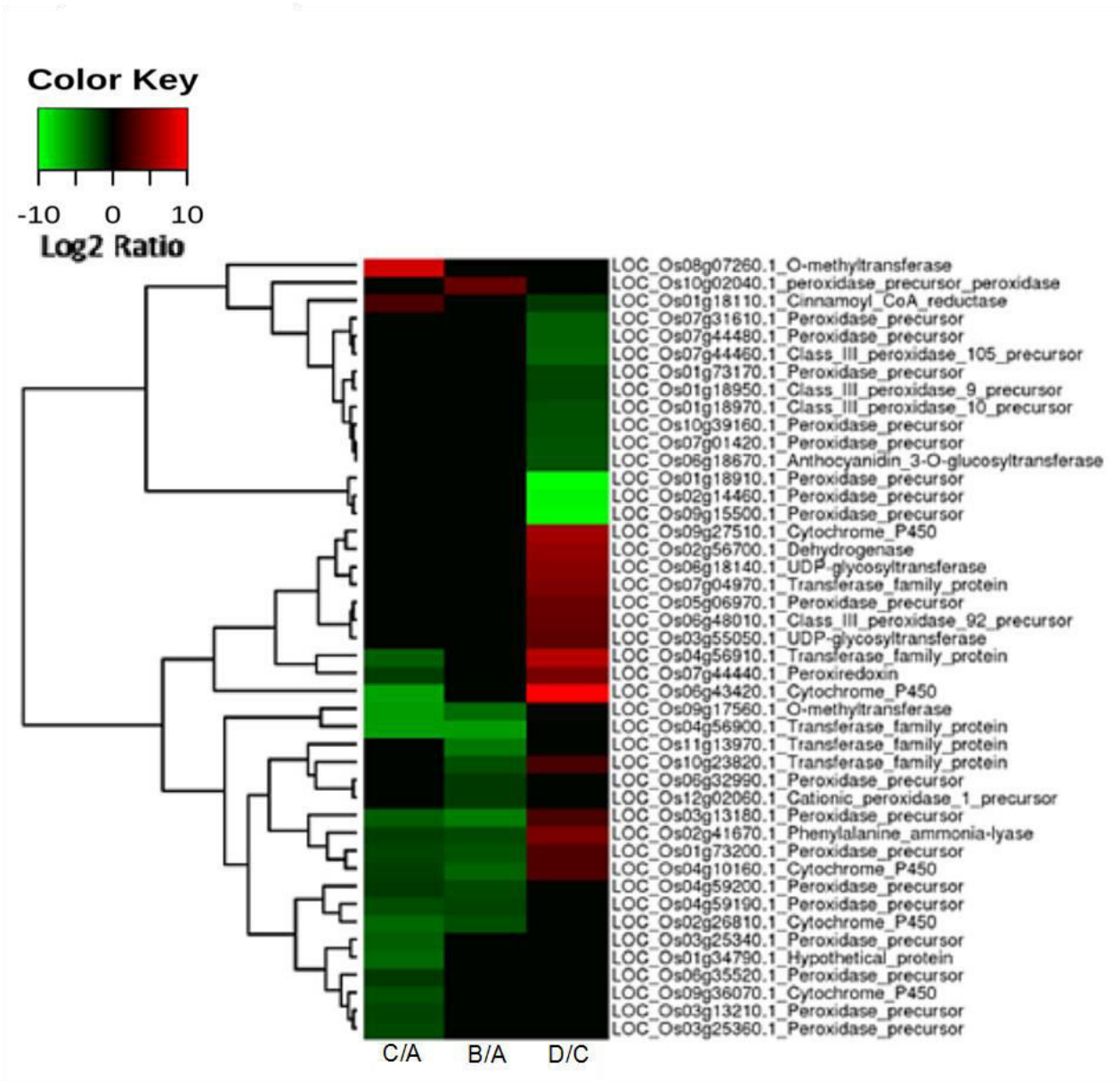


Figure S11. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed phenylpropanoid pathway genes in roots of vector control RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmap is supplemented with a color coded scale bar depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

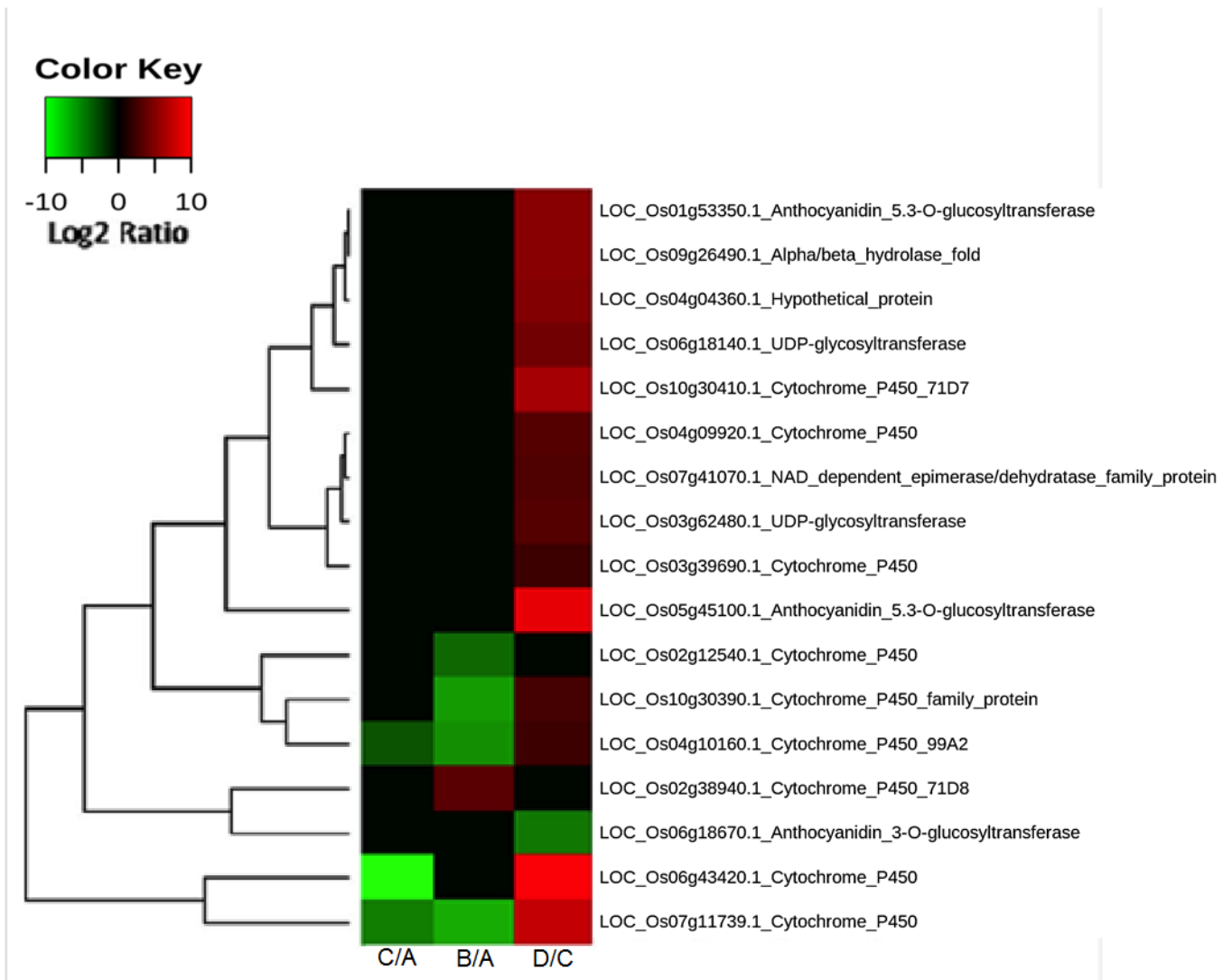


Figure S12. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed isoflavonoid biosynthesis pathway genes in roots of vector control RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmaps are supplemented with color coded scale bars depicting the relative expression levels of genes in log2 scale.

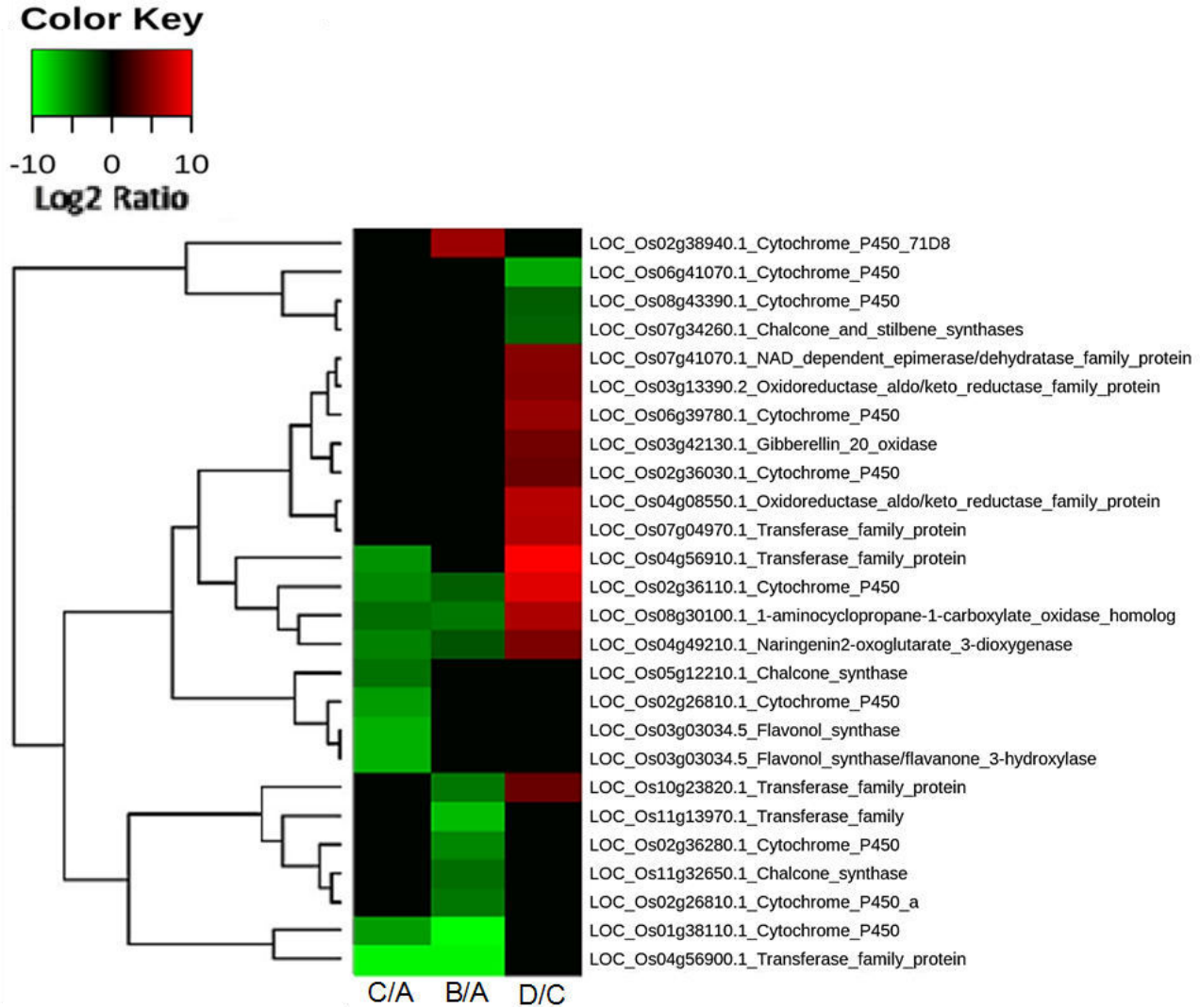


Figure S13. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed flavonoid biosynthesis pathway genes in roots of vector control RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmaps are supplemented with color coded scale bars depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

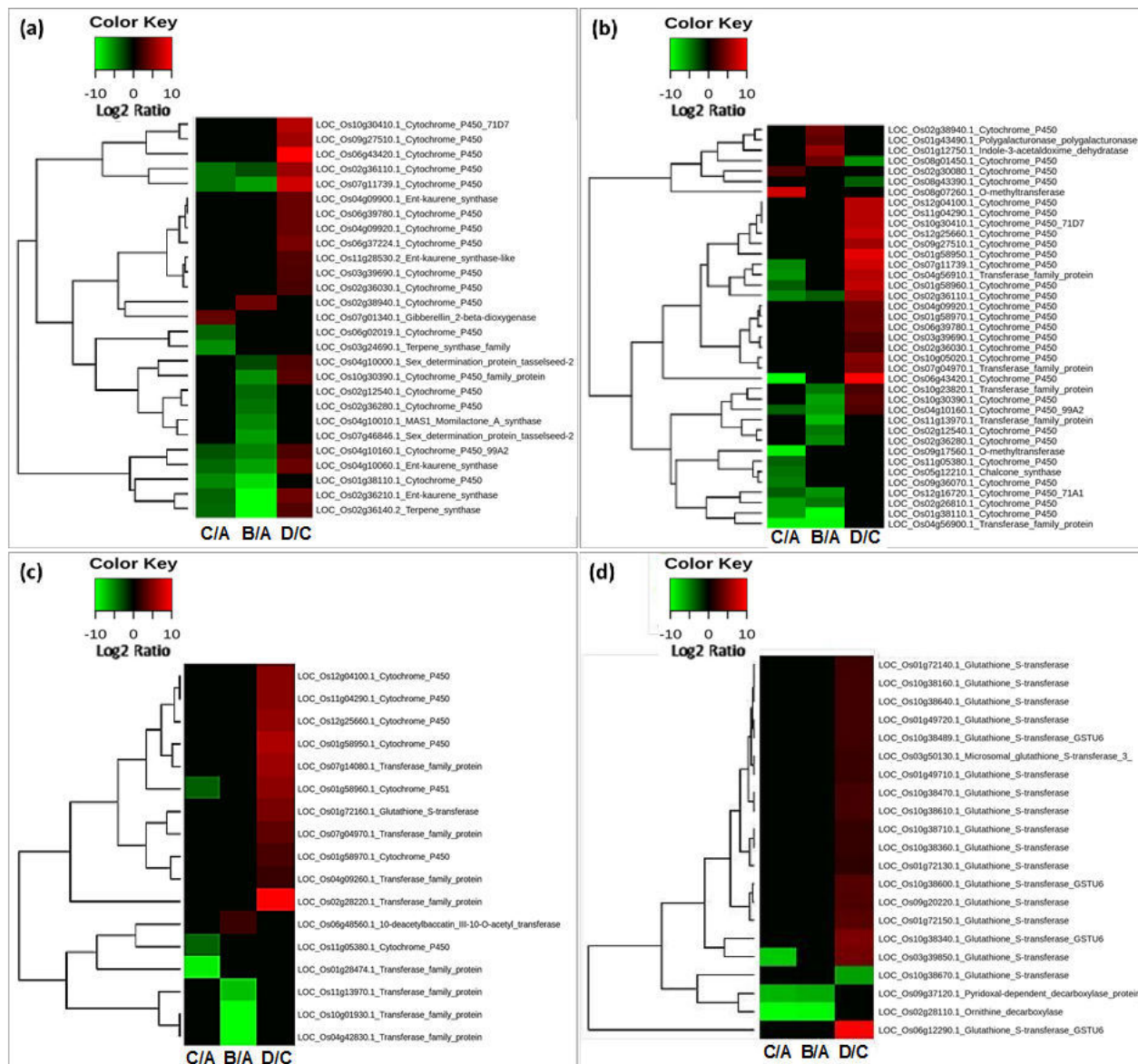


Figure S14. Heatmaps of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes involved in (a) diterpenoid, (b) stilbenoid/diarylheptanoid/gingerol and (c) cutin/ suberine/wax biosynthesis pathways and (d) glutathione metabolism in roots of vector control RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmaps are supplemented with color coded scale bars depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

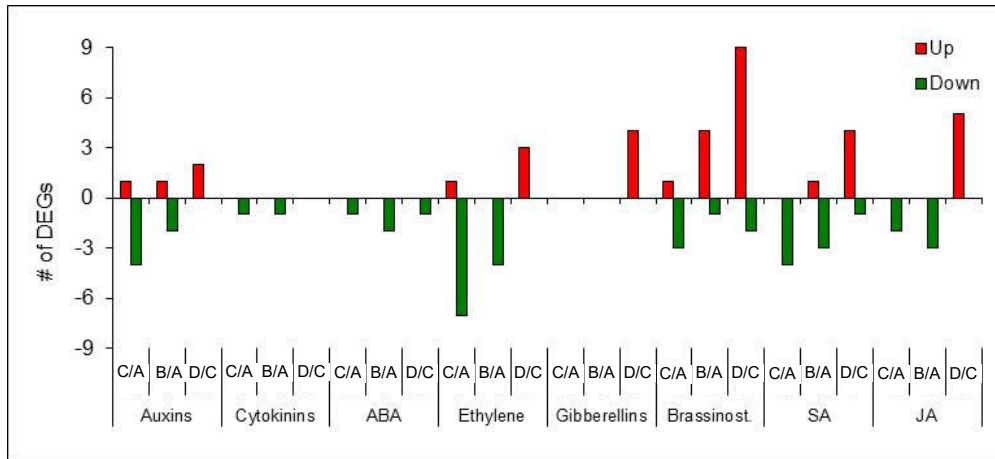


Figure S15. KEGG analysis of differentially expressed genes in phytohormone biosynthetic pathways in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants.

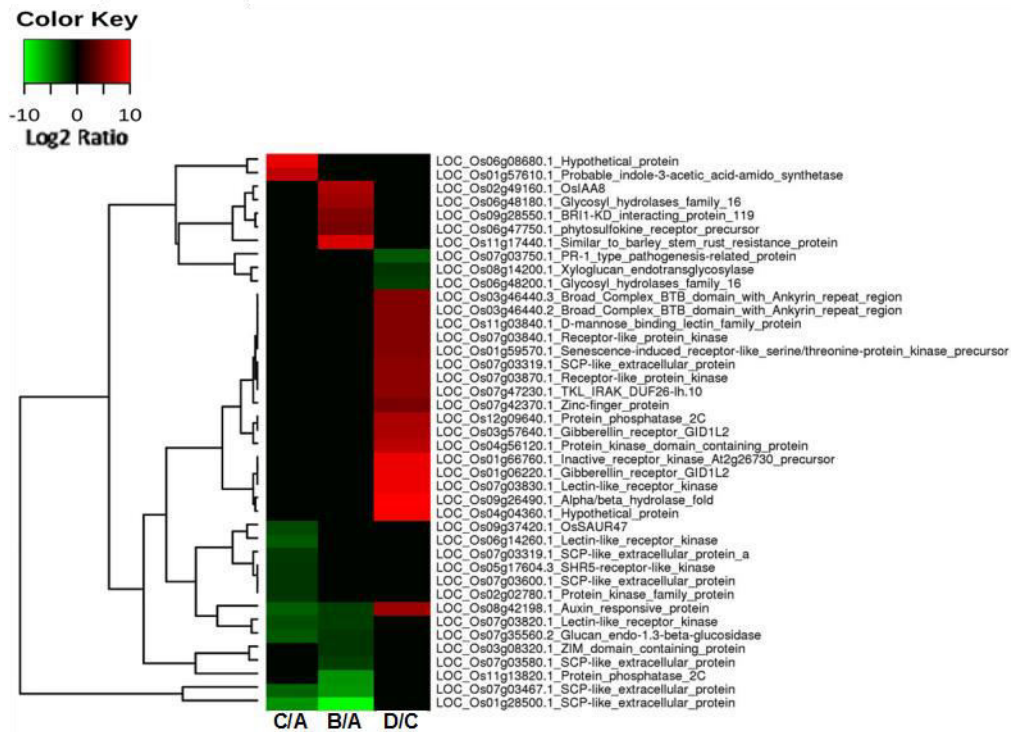


Figure S16. Heatmap of the hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes associated with phytohormone biosynthetic pathways in roots of vector control RMh and PhL plants treated with or without Nod factors. (C/A) PhL vs RMh plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants, and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants. Heatmap is supplemented with a color coded scale bar depicting the relative expression levels of genes in log₂ scale.

Table S1. Primers used in the present study.

Gene / ID	Primer	Sequence
For amplification of the rice promoters		
<i>OsRCg2</i> promoter (LOC_Os10g40430)	PrOsRCg2-For (AgeI) PrOsRCg2-Rev (XhoI)	5'- <u>ACCGGTCTGCAGCTGATCTCAACAGT</u> -3' 5'- <u>CTCGAGGGATGCAGCTAGCGAGCTAGTGAT</u> -3'
<i>OsACT1</i> Promoter (LOC_Os03g50885)	PrAct1-For (XhoI) PrAct1-Rev (NcoI/SalI)	5'- <u>AGCATACTCGAGGTCATTCATATG</u> -3' 5'- <u>CTCCATGGGTCGACTCTACCTACAAAAAAGCTCCGCACG</u> -3'
For amplification of the CDS of the legume genes		
<i>MtNFP</i> (DQ496250.1)	MtNFP-For (BglII) MtNFP-Rev (KpnI)	5'- <u>AGATCTATGTCTGCCTTCTTTCTTCTTCTAG</u> -3' 5'- <u>GGTACCTTAACGAGCTATTACAGAAGTAACAAC</u> -3'
<i>MtLYK3</i> (AY372406.1)	MtLYK3-For1 (SacI) MtLYK3-Rev1 (SpeI)	5'- <u>GAGCTCATGAATCTCAAAAATGGATTAC</u> -3' 5'- <u>ACTAGTTCATCTAGTTGACAACAGATTTATG</u> -3'
<i>MtSYMREM1</i> (JQ061257.1)	MtREM-For (BglII)* MtREM-Rev (XmaI)*	5'- <u>AGATCTGCTGTAACCCTAGAGATACATTATGG</u> -3' 5'- <u>CCCGGGCTAACTGAAAAACCTTAAACCGCTGA</u> -3'
<i>LjLNP</i> (AF156780.1)	LjLNP-For (XhoI)* LjLNP-Rev (XmaI)*	5'- <u>CTCGAGGCATTGGACTAAAGCCATGG</u> -3' 5'- <u>CCCGGGCAGGCTTAAGCAGGTACTAGTA</u> -3'
For RT-PCR analyses of the legume transgene expression in rice		
<i>MtLYK3</i>	MtLYK3 5'-F MtLYK3 3'-R	5'- GTGTGATGTAGCTTTAGCTTC -3' 5'- GATACGTAAACTCTGTGCAGCTTG -3'
<i>MtNFP</i>	MtNFP 5'-F MtNFP 3'-R	5'- GCCTTCTTCTTCTTCTAG -3' 5'- GTAACCTATCTGCAGTCTCG -3'
For RT-qPCR analyses of gene expression in rice		
<i>Os Nicotianamine synthase</i> (LOC_Os03g19420.2)	OsNicS-F OsNicS-R	5'- TCTGAGTGCCTGCATAGTAATCC -3' 5'- CACCTCTTGCTTTCTCAGCACC -3'
<i>Os Major facilitator superfamily antiporter</i> (LOC_Os11g04020.1)	OsMFSA-F OsMFSA-R	5'- TTGCGTTGACCTTCAAGCCG -3' 5'- GTCTATGCTTGCATCCACGC -3'
<i>Os Expressed protein 1</i> (LOC_Os02g33070.1)	OsEP1-F OsEP1-R	5'- TCGCCCAACCTGATCCGCTG -3' 5'- TTCTTGACTCCTTTCCCACTGTACAG -3'
<i>Os Expressed protein 2</i> (LOC_Os08g05960.1)	OsEP2-F OsEP2-R	5'- TGCTAGTGTTGCTAGGGAGG -3' 5'- CAACAGGATAACGAGTACAGAGC -3'
<i>Os Glutathione S-transferase GSTU6</i> (LOC_Os10g38340.1)	OsGST-F OsGST-R	5'- CCAGTTGAAGTTTGTGAATCC -3' 5'- TAGAATAGCCACTTCCCAC -3'
<i>Os Transketolase</i> (LOC_Os07g09190.1)	OsTK-F OsTK-R	5'- GCACTTCAGCTCAGCTGAA -3' 5'- CAAGAAACACATACACATGGGC -3'

<i>Os Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein</i> (LOC_Os04g27060.1)	OsAKR-F OsAKR-R	5'- ACGTTGTGCAAGGTGACAG -3' 5'- CACATGGCAAAAACACTGGAACA -3'
<i>Os B12D protein</i> (LOC_Os07g41350.1)	OsB12D-F OsB12D-R	5'- GTGACCGTCAAAACTGATCC -3' 5'- TAAGTTCGCACGTATGCGAC -3'
<i>Os Formin-binding protein-related</i> (LOC_Os06g11170.1) (reference gene 1)	OsNABP-F OsNABP-R	5'- GGAATGTGGACGGTGACACT- 3' 5'- TCAAAATAGAGTCCAGTAGATTTGTCA -3'
<i>Os Expressed protein</i> (LOC_Os07g02340.1) (reference gene 2)	OsEP-F OsEP-R	5'- AGGAACATGGAGAAGAACAAGG -3' 5'- CAGAGGTGGTGCAGATGAAAGTC -3'
<i>Os 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i> (LOC_Os06g48970.1) (reference gene 3)	OsPrK-F OsPrK-R	5'- GGCGCTTAAAGAACTTAAGAGGA -3' 5'- TGCATCGTAGCCCCTGTAATG -3'

Embedded restriction sites in primers are underlined; *These primers were also used for RT-PCR analyses

Table S2. PCR conditions for amplification of rice promoters and legume genes.

Promoter / Gene	PCR conditions
<i>OsRCg2P</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 66°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)
<i>OsACT1P</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 55°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)
<i>MtLYK3</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 60°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)
<i>MtNFP</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 60°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)
<i>MtSYMREM1</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 62°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)
<i>LjLNP</i>	94°C - 5 min (1 cycle); 94°C - 30 sec, 62°C - 1 min, 72°C - 2 min (35 cycles); 72°C - 7 min (1 cycle)

Reaction mix: For PCR reaction (15 µL) we used Advantage amplification buffer 1x (Clontech, USA), NTPs 0.2mM, forward and reverse primers 1.3 µM and 1.5 U of Advantage2 polymerase (Clontech, USA).

Table S3. Multi-cloning site (MCS) and adaptor sequences.

MCS/Adaptor	Strand	Sequence
ZmUbi-MCS	Sense	5'- TTGGATCCTAAACTAGTTAACCCGGGTAAGGTACCTT -3'
	Anti-sense	5'- AAGGTACCTTACCCGGGTTAACTAGTTTAGGATCCAA -3'
<u>WAct-MCS:</u>	Sense	5'- ACGCGTCGACTGATCTAGATAGCCCGGGTAGACTAGTTAGGGTACCCTAA -3'
	Anti-sense	5'- TTAGGGTACCCTAACTAGTCTACCCGGGCTATCTAGATCAGTCGACGCGT -3'
Age1/BglII adaptor	Sense	5'- CCGGTCTCCAGTGACATA -3'
	Anti-sense	5'- GATCTATGTCACTGGAGA -3'

Table S5. Expression levels of the transgenes *MtNFP*, *MtLYK3*, *LjLNP* and *MtSYMREM1* in roots of the rice (PhL) plants treated with or without Nod factors.

Accesión #	Name	# reads C	# reads D	RPKM C	RPKM D	Log2ratio D/C	Coverage % C	Coverage % D
DQ496250.1	<i>MtNFP</i> *	8182	12291	357.98	539.18	0.58	100	100
AY372406.1	<i>MtLYK3</i> *	1437	1706	60.69	72.24	0.25	91	94
AF156780.1	<i>LjLNP</i> *	559	752	32.28	43.55	0.42	57	68
JQ061257.1	<i>MtSYMREM1</i> *	2024	3355	250.44	416.23	0.73	100	100

*Expression of *MtNFP*, *MtLYK3*, *LjLNP* and *MtSYMREM1* genes in rice (PhL) plants was driven by *ZmUBI*, *OsACT1*, *OsRCg2* and *MAS* promoters, respectively. (C) PhL rice plants not treated with Nod factors; (D) PhL rice plants treated with Nod factors

Table S6. Expression levels of the rice homologues of the legume Nod signal pathway genes were unaltered in vector control (RMh) as well as in the transgenic (PhL) rice plants, irrespective of Nod factor treatment.

Rice CSP gene IDs					log2 Ratio			
RPKM								
		A	B	C	D	C/A	B/A	D/C
OslYK3:	LOC_Os08g42580	1.32	1.29	1.21	0.99	+0.18, -0.13	-0.15, -0.03	-0.29, +0.24
OsnNFP:	LOC_Os03g13080.1	0.81	1.59	0.97	0.59	+0.26	+0.97	-0.71
OsnSYMRK:	LOC_Os07g38070.1	14.05	14.43	13.21	13.43	-0.09	-0.15, -0.03	+0.02
OsnPOLLUX:	LOC_Os01g64980	0.87, 0.37	0.65, 0.31	1.15, 0.5	0.96, 1.29	+0.44, +0.4	-0.41, -0.24	-0.79, -0.26
OsnCASTOR:	LOC_Os03g62650	0.05	0.02	0.07, 0.05, 0.07	0.07, 0.03	+2.89, +2.29, +0.57	-1.0	+0.004, -2.89, -1.0
OsnNUP133:	LOC_Os03g12450	16.11	15.89	19.3	19.5	+0.26	-0.02	+0.01
OsnNUP85:	LOC_Os01g54240	1.74, 0.16	2.62	1.84, 0.06	2.29, 0.06	+0.08, -1.34	+0.59, -4.01	+0.32, +0.004
OsnNENA:	LOC_Os01g0620100	-	-	-	-	-	-	-
OsnCCaMK:	LOC_Os05g41090.1	15.32	16.66	15.62	26.59	+0.03	+0.12	+0.77
OsnCYCLOPS:	LOC_Os06g02520.1	5.74	7.57	6.3	9.94	+0.13	+0.4	+0.66
OsnNSP1:	LOC_Os03g29480.1	2.81	2.56	3.33	3.54	+0.25	-0.14	+0.09
OsnNSP2:	LOC_Os03g15680.1	0.7	1.77	0.83	1.01	+0.25	+1.35	+0.29
OsnERN1:	LOC_Os07G10410	2.4	3.21	1.58	1.29	-0.6	+0.42	-0.3
OsnNLP1:	LOC_Os03g0131100	-	-	-	-	-	-	-

Table S7. Differential expression of early nodulin-like genes in roots of the RMh and PhL rice plants treated with or without Nod factors. Log2ratio \geq 1.5]. (C/A) RMh vs PhL plants without Nod factor treatment, (B/A) Nod factor treated RMh plants vs untreated RMh plants and (D/C) Nod factor treated PhL plants vs untreated PhL plants.

C/A

Gene ID	Name	Log2ratio C/A	FDR	Coverage A	Coverage C	
LOC_Os03g47810.1	OsMFS1/Nodulin family protein	-1.50	3.45E-07	85.36%	57.55%	
LOC_Os01g36590.1	Nodulin, putative, expressed	-2.34	2.18E-05	60.06%	19.33%	*
LOC_Os06g04940.2	ENOD93 protein, putative, expressed	-2.39	0.0002	19.18%	14.93%	*
LOC_Os06g04990.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-2.50	7.87E-239	83.80%	76.94%	*
LOC_Os06g05020.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-2.89	2.38E-14	13.56%	13.81%	*
LOC_Os06g05010.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-3.48	1.36E-08	13.96%	10.81%	*
LOC_Os08g42350.1	OsSWEET11/Os8N3/MtN3	-3.85	6.82E-15	78.04%	12.54%	
LOC_Os05g32150.1	Nodulin MtN3 family protein, putative, expressed	-3.86	4.31E-09	88.42%	18.22%	*
LOC_Os06g05000.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-4.24	2.04E-65	89.97%	50.13%	*
LOC_Os06g04940.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-4.34	0.00012	19.18%	14.93%	*

B/A

Gene ID	Name	Log2ratio	FDR	Coverage A	Coverage B	
LOC_Os04g59020.1	OsNodulin-like2	1.80	4.26E-10	68.76%	88.98%	
LOC_Os01g42110.1	OsSWEET6a	-1.79	1.00E-12	93.97%	83.21%	
LOC_Os06g04990.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-1.89	3.59E-166	83.80%	95.56%	*
LOC_Os06g05020.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-2.00	3.39E-09	13.56%	13.81%	*
LOC_Os08g42350.1	OsSWEET11/Os8N3	-2.69	1.58E-10	78.04%	24.32%	
LOC_Os06g05010.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-2.87	4.73E-07	13.96%	11.56%	*
LOC_Os06g05000.1	ENOD93 protein, putative, expressed	-3.67	6.87E-56	89.97%	67.10%	*

D/C

Gene ID	Name	Log2ratio	FDR	Coverage C	Coverage D	
LOC_Os10g08850.1	Nodulin, putative, expressed	-2.59	2.67E-54	97.73%	75.65%	*